Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. R.–E. Bader

EINFLUSS VERSCHIEDENER FESTER NÄHRMEDIEN AUF DAS ERGEBNIS DER RESISTENZBESTIMMUNG GEGEN GENTAMICIN BEI GRAMNEGATIVEN BAKTERIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Roland Keilhauer
aus Putinci/Jugoslawien

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546528_0104

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. R.–E. Bader

EINFLUSS VERSCHIEDENER FESTER NÄHRMEDIEN AUF DAS ERGEBNIS DER RESISTENZBESTIMMUNG GEGEN GENTAMICIN BEI GRAMNEGATIVEN BAKTERIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Roland Keilhauer
aus Putinci/Jugoslawien

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. W. Schlote

Berichterstatter: Professor Dr. med. R.-E. Bader

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG 1
1. Resistenzproblem 1
2. Definition der Resistenz bei der klinisch-bakteriologischen Untersuchung 2
II. MATERIAL UND METHODIK 5
A. Material 5
1. Teststämme 5
2. Nährmedien 7
3. Antibiotikum 8
B. Methodik 9
1. Agardiffusionstest 9
2. Röhrchenverdünnungstest 10
3. Agarverdünnungstest 10
C. Zusatzversuche 11
1. pH-Abhängigkeit der Hemmhofdurchmesser 11
2. Agardiffusionstest mit Agarscheibchen 11
3. "Handicap-Test" 12
III. ERGEBNISSE 12
IV. BIOMETRISCHE AUSWERTUNG 33
1. Varianzanalyse 33
2. Regressionsanalyse 41
V. DISKUSSION 54
1. Hemmhoftheorie 54
2. Vorteile und Nachteile von Agarmedien 56
3. Agarverdünnungstest contra Röhrchenverdünnungstest 58
4. Der Hemmhofdurchmesser als Kriterium einer Sensibilitätsbeurteilung 60
5. Überprüfung der Regressionsgeraden mit Hilfe der "Standardgeraden" 61
6. Der Einfluß von Wechselwirkungen auf die Hemmhofgröße 64
VI. ZUSAMMENFASSUNG 66
VII. LITERATURVERZEICHNIS 68

I. Einleitung

1. Resistenzproblem

Das Antibiogramm ist heute ein wichtiger Bestandteil jeder kritischen Antibiotikatherapie. Die Erfahrung hat gezeigt, daß besonders bei einigen gramnegativen Bakterienarten die Sensibilitätsbestimmung angezeigt ist, da diese Spezies oft gegen eine Vielzahl von Antibiotika resistent sind und die jeweilige Beeinflußbarkeit durch Antibiotika nicht vorauszusehen ist. Im Zusammenhang mit der übertragbaren Resistenz hat vor allem die Entdeckung der episomalen Resistenzentwicklung durch WATANABE (1963) das Resistenzproblem in ein neues Licht gerückt. Unter episomaler Resistenzentstehung versteht man die Übertragung extrachromosomaler Genelemente von einer Bakterienzelle zur anderen, die den genetischen Code für die Antibiotikaresistenz besitzen. Diese über Plasmabrücken weitergegebenen Episome werden auch Resistenz-(R)-Faktoren genannt und sind weit häufiger die Ursache verringerter oder fehlender Keimempfindlichkeit, als die durch Mutation am Bakterienchromosom entstehende Antibiotikaresistenz (WALTER, HEILMEYER, 1969). Die große Bedeutung der episomalen Resistenzentwicklung liegt darin, daß ein und derselbe R-Faktor, sofern er als Resistenzdeterminante feststeht, bei den einzelnen Spezies unterschiedliche Sensibilität bewirken kann (SMITH, 1969); ferner können durch R-Faktoren Mehrfachresistenzen übertragen werden. Diese Eigenart der R-Faktoren könnte die oben erwähnte unsichere Antibiotikawirkung bei gramnegativen Keimen erklären, da gerade diese Spezies besonders häufig R-Faktoren besitzen und untereinander austauschen.

2. Definition der Resistenz bei der klinisch-bakteriologischen Untersuchung.

Für die Resistenz hinsichtlich der klinisch-bakteriologischen Untersuchung hat ein Expertenkomitee der World Health Organisation (WHO) 1961 folgende zwei Definitionen postuliert:

(1) Ein Mikroorganismus ist resistent gegenüber einem Antibiotikum, wenn es einer Konzentration widersteht, die höher ist als die in vivo erreichbare.

(2) Ein Mikroorganismus ist resistent gegenüber einem Antibiotikum, wenn es eine Konzentration toleriert, die höher ist als jene, die die Mehrzahl der Population desselben Stammes in ihrer Vermehrung hemmt.

Die erste Definition ist die Interpretationsbasis für den Röhrchenverdünnungstest, der einer Verdünnungsreihe mit Nährbouillon und dem betreffenden Antibiotikum entspricht. Die Keimempfindlichkeit wird durch die minimale Hemmkonzentratio (MHK) definiert. Die minimale Hemmkonzentration entspricht der niedrigsten Antibiotikumkonzentration, bei welcher die Nährbouillon als erste in der Verdünnungsreihe keine optisch sichtbare Trübung durch die Keimvermehrung zeigt. Dieser so, in vitro, gefundene Konzentrationswert wird mit der erreichbaren Serumkonzentration, in vivo, des gleichen Antibiotikums verglichen. Übersteigt die Antibiotikumkonzentration in vitro diejenige in vivo, so ist der zuständige Keim nach der ersten Definition als resistent zu betrachten.

Dasselbe gilt auch für den Agarverdünnungstest, welcher ein "Pendant" zum Röhrchenverdünnungstest ist. Anstatt Nährbouillon wird hier Agar verwendet, und die verschiedenen Verdünnungs-

stufen werden in Petrischalen gegossen. Die minimale Hemmkonzentration stellt jene Antibiotikumkonzentration dar, bei welcher auf der betreffenden Agaroberfläche keine sichtbaren Kolonien mehr zu erkennen sind.

Die zweite Definition gilt für den Agardiffusionstest, bei welchem das betreffende Antibiotikum von einem Depot aus (Filterpapierblättchen, Tablette, Agarscheibchen, Zylinder, Papierstreifen etc.) in ein festes Nährmedium diffundiert. Die Bakterien werden hier nicht einer bestimmten Antibiotikumkonzentration ausgesetzt, sondern einem weitgehend unbekannten Antibiotikumkonzentrationsgefälle, welches sich pro Zeiteinheit ändert, solange die Antibiotikumdiffusion anhält. Als Kriterium der Keimempfindlichkeit wird hier der im Bakterienrasen entstehende Hemmhofdurchmesser genommen, welcher als Ausdruck einer gehemmten Keimvermehrung aufzufassen ist. Sind innerhalb eines Hemmhofes noch Kolonien eines Stammes vorhanden, so ist dieser Stamm gemäß der zweiten Definition als resistent anzugeben.

Nach BAUER (1964 b) kann die Deutung der Sensibilitätsbestimmung auf der Basis nur einer der beiden Resistenzdefinitionen zu einer fehlerhaften Interpretation der wahren Keimempfindlichkeit führen. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit neben dem Agardiffusionstest auch der Röhrchenverdünnungstest und der Agarverdünnungstest zur Sensibilitätsbestimmung angewendet.

Es wurden 188 gramnegative Bakterienstämme verschiedener Spezies auf vier verschiedenen, für die Resistenzbestimmung empfohlenen festen Nährmedien im Agardiffusionstest untersucht. Hierbei wurden die wichtigsten Einflußgrößen des Agardiffusionstestes

wie die Agarsorte, die Blättchenbeschickung, die verschiedenen Spezies, sowie die einzelnen Stämme innerhalb der Spezies bezüglich ihrer Einwirkung auf die Hemmhofgröße statistisch ausgewertet. - Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration wurde der Röhrchenverdünnungstest (Mueller-Hinton-Broth von Difco) und der Agarverdünnungstest (D.S.T.-Agar von Oxoid) angewendet.

Die Prüfung auf Übereinstimmung der beiden Untersuchungsmethoden (resp. Resistenzdefinitionen) wurde mittels einer Regressions- und Korrelationsanalyse vorgenommen. Zur Überprüfung der Regressionsgeraden, welche die Beziehung des Hemmhofdurchmessers zur minimalen Hemmkonzentration herstellen soll, wurde die sog. "Standardgerade" eingeführt, welche entsprechend der Regressionsgeraden die Beziehung zwischen Hemmhofdurchmesser und Blättchenbeschickung darstellt.

Schließlich wurden die theoretischen Grundlagen über die Antibiotikumdiffusion im Agarnährboden und die Entstehung des Hemmhofdurchmessers am Beispiel der, von COOPER (1955) aufgestellten, Formel diskutiert.

Als Antibiotikum diente Gentamicin° , welches von WEINSTEIN et al 1963 isoliert wurde und für welches SMITH (1969) einen Resistenzfaktor entdeckt hat.

° Die ursprüngliche Schreibweise von Gentamicin mit einem "y" wurde auf Vorschlag des AMA Comitee on Generic Names in ein "i" umgewandelt.

II. Material und Methodik

A. Material

1. Teststämme

Zur Verfügung standen Bakterienstämme, die alle bei der bakteriologischen Diagnostik aus anfallendem klinischen Untersuchungsmaterial isoliert wurden und zum Teil auch von SANDER und BLASIUS (1968) sowie von GRÖTZINGER (1972) bei Untersuchungen verwendet wurden.

Pseudomonas aeruginosa	47 Stämme
Escherichia coli	39 Stämme
Proteus mirabilis	39 Stämme
Proteus rettgeri	16 Stämme
Proteus morganii	15 Stämme
Proteus vulgaris	15 Stämme
Klebsiella-Aerobacter	17 Stämme

Die Bestimmung von Pseudomonas aeruginosa erfolgte nach folgenden Kriterien (GIBBS und SKINNER, 1966):

(1) Koloniemorphologie (ausgefranste Ränder, Ofenrohrglanz)

(2) Hämolyse-Reaktion auf Blutagarplatten

(3) Oxydase-Bildung, nachgewiesen nach der Methode von KOVACS (1956)

(4a) Oxydative Spaltung von Glucose im Medium nach Hugh und Leifson (1953)

(4b) Fehlende fermentative Spaltung von Glucose im Medium nach Hugh und Leifson (1953)

(5) Vermehrung bei 42°C

(6) Pyocyaninbildung auf dem Nährmedium A und Fluorescinbildung auf dem Nährmedium B nach KING, WARD, RANEY (1954), sowie Fluoreszenz im UV-Licht.

Reaktion	Pr. vulgaris	Pr. mirabilis	Pr. rettgeri	Pr. morganii	E.coli	Klebs. Aerob.
1. Glucose-vergärung	+	+	+	+	+	+
2. Gasbildung aus Glucose bei 37°C	+	+	-/(+)	+	+	+
3. Gasbildung aus Glucose bei 45°C					+	
4. Laktose-vergärung	-	-	-	-	+	+
5. Mannit-vergärung	-	-	+	-		
6. Indolbildung	+	-	+	+	+	-
7. H_2S-Bildung	+	+	-	-	-	-
8. Beweglichkeit	+	+	+	+	+	-/+
9. Harnstoffspaltung	+	+	+	+	-	
10. Verwertung von Zitrat als einziger C-Quelle bei NH_4^+ als einziger N-Quelle	-	-	+	-	-	+
11. Phenylalaninspaltung (nach Ewing)	+	+	+	+		
12. Methyolrotreaktion					+	-
13. Voges-Proskauer-Reaktion					-	+
14.+ Medium nach SCHOOP und KOSHIDA (1973)	gelb braun +/+	gelb braun +/+	gelb braun ±/-	gelb braun +/-	gelb gelb +/-	gelb rote Spitze +/-

Tab. 1. Übersicht über die zur biochemischen Artbestimmung der Enterobacteriaceae benützten Reaktionen (nach SCHOOP, 1970 und GRÖTZINGER, 1972)

+Die Angabe der Reaktionen erfolgte in der Reihenfolge: Stich, Schrägfläche, H_2S/Gas.

Die Differenzierung der Enterobacteriaceae wurde von SCHOOP (1970) und GRÖTZINGER (1972) nach den in Tabelle 1 aufgeführten biochemischen Kriterien durchgeführt.

2. Nährmedien

Es wurden insgesamt vier feste Nährmedien mit dem Agardiffusionstest untersucht:

(a) D.S.T.-Agar: Diagnostic Sensitivity Test Agar Base von Oxoid (pH 7,4)

Zusammensetzung:	Gramm je Liter
Proteose-Pepton	10,0
Kalbfleischextrakt (Trockensubstanz)	10,0
Traubenzucker	2,0
Natriumchlorid	3,0
Dinatriumphosphat	2,0
Natriumacetat	1,0
Guaninhydrochlorid	0,01
Uracil	0,01
Xanthin	0,01
Ionagar Nr. 2	12,0
Adeninsulfat	0,01

(b) Mueller Hinton Medium von Difco (pH 7,4)

Zusammensetzung der Trockensubstanz:	
Rinderbrühe	300,0 g
Bacto-Casaminosäuren	17,5 g
Stärke	1,5 g
Bacto-Agar	17,0 g

38 g der Trockensubstanz werden in 1000 ml destillierten Wassers suspendiert.

(c) Normalagar (pH 7,0)

Zusammensetzung aus der Nährbouillon Nr. 2 von Oxoid und Fadenagar:	Gramm je Liter
Proteose Pepton (Oxoid L 46)	10,0
Kalbfleischextrakt	10,0
Natriumchlorid	5,0
Fadenagar	2,5

(d) Penassay Seed Agar von Difco (pH 6,6)

Zusammensetzung der Trockensubstanz:	
Bacto-Rinderextrakt	1,5 g
Bacto-Hefeextrakt	3,0 g
Bacto-Casein	4,0 g
Bacto-Pepton	6,0 g
Bacto-Dextrose	1,0 g
Bacto-Agar	15,0 g

Aufgelöst wurden 30,5 g auf 1000 ml destillierten Wassers.

Als flüssiges Nährmedium für den Röhrchenverdünnungstest diente Bacto Mueller Hinton Broth von Difco. Diese Bouillon enthält die Zusammensetzung des Mueller Hinton Mediums ohne Agarzusatz.

3. Antibiotikum

Gentamicin stand als Sulfat in Form von Trockenpulver zur Verfügung. Der Gehalt an aktiver Base betrug 612 ug/mg Sulfat (Charge Nr. 7852173) und 638 ug/mg Sulfat (Charge Nr. 7852296). Vor jedem Versuch wurde die jeweils errechnete Sulfatmenge genau abgewogen und in entsprechender Menge Aqua destillata gelöst. Danach wurde die Lösung mit einem einem bakteriendichten Filter sterilisiert.

Gentamicin wurde uns freundlicherweise von der Firma E. Merck AG, Darmstadt zur Verfügung gestellt.

B. Methodik

1. Agardiffusionstest

Antibiotikumblättchen: Als Testblättchen dienten Filterpapierblättchen (Schleicher und Schüll 23) von 9 mm Durchmesser, die jeweils mit 10 ug, 20 ug und 30 ug Gentamicin beschickt wurden. Das Beschickungsvolumen entsprach mit 0,02 ml Gentamicinlösung der Aufsaugkapazität der Papierblättchen. Die beschickten Testblättchen wurden im Exsikkator getrocknet und aufbewahrt.

Agarplatten: Es wurden Plastikpetrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm verwendet, in die jeweils 10 ml Agar eingefüllt wurde. (Neuerdings werden 25 ml Agar vorgeschlagen, um eine Agartiefe von ca. 4 mm zu erreichen (ERICSSON, SHERRIS, 1971)).

Bei der Beimpfung der Agarplatten sollte auf Vorschlag einer Arbeitsgruppe um ERICSSON (1964) ein dichter aber nicht konfluierender Bakterienrasen erzielt werden. Diese Bedingung wurde folgendermaßen erfüllt: Es wurde eine Nährbouillon (Nutrient Broth No. 2 - Oxoid) mit einer Kolonie von einer Blutagarplatte beimpft und sechs Stunden lang bei 37°C bebrütet. Nach dieser Zeit wurde die Bouillonkultur 1 : 100 verdünnt und davon 1 Tropfen (0,05 ml) mit einem Glasspatel gleichmäßig auf der Agaroberfläche verteilt.

Zur Vordiffusion des Antibiotikums wurden die mit den Testblättchen versehenen Agarplatten drei Stunden bei Kühlschranktemperatur gehalten. Danach wurden sie im Brutschrank 18 Stunden lang bebrütet. Der Hemmhofdurchmesser wurde mit einem Lineal an der Unterseite der Petrischale abgelesen.

2. Röhrchenverdünnungstest

Ausgehend von zwei Hauptverdünnungslösungen wurden in mehreren Erlenmeyerkolben die Stammlösungen einer Verdünnungsreihe mit dem Faktor zwei hergestellt. Die Endpunkte dieser Verdünnungsreihe waren 0,25 ug/ml und 128 ug/ml. Von jedem Erlenmeyerkolben wurden jeweils 2 ml in ein Reagenzglas pipettiert. Die Beimpfung erfolgte mit 2×10^5 Keimen, die in einem Tropfen (~ 0,05 ml) einer 10^{-2} verdünnten 6-Stunden-Bouillon enthalten waren und somit der Anforderung der Weltgesundheitsorganisation entsprach (10^5 - 10^6 Keime/ml) (ERICSSON (1964) . Die minimale Hemmkonzentration wurde bei jenem Reagenzglas abgelesen, dessen Bouillon nach 18 Stunden Bebrütung bei 37°C, als erstes in der Reihe keine sichtbare Trübung mehr zeigte.

3. Agarverdünnungstest

Zur Herstellung einer Verdünnungsreihe von 0,25 ug/ml bis 128 ug/ml entsprechend dem Röhrchenverdünnungstest, wurden in mehreren Erlenmeyerkolben Stammlösungen hergestellt. Die jeweiligen Verdünnungsstufen wurden mit der entsprechenden, auf 50° - 60°C abgekühlten D.S.T.-Agarmenge vermischt und in Petrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm gegossen. Zur Beimpfung wurde mittels einer Pipette ein kleiner Tropfen (0,025 ml) einer 10^{-1} verdünnten 6-Stunden-Bouillon auf den Agar aufgebracht, welcher hinreichend genau 10^6 Keime enthielt (nach neueren Empfehlungen sollte mit 10^4 Keimen beimpft werden (ERICSSON, SHERRIS 1971)). Die Bebrütungszeit war 18 Stunden. Auf der Unterseite der Petrischalen wurden Zahlen von 1 bis 10 mit einem Filzfaserstift angebracht,

die dem jeweiligen Tropfen entsprachen und somit den betreffenden Stamm kennzeichneten. Die minimale Hemmkonzentration wurde dort abgelesen, wo zum erstenmal in der Reihe keine Kolonien mehr sichtbar waren.

C. Zusatzversuche

1. pH-Abhängigkeit der Hemmhofdurchmesser

Die jeweiligen Agarsorten wurden bei etwa 50°C (noch flüssiger Zustand) mit Na OH und HCl auf die gewünschten pH-Werte gebracht. Die Kontrolle des pH erfolgte durch einen pH-Meter. Nach der pH-Einstellung wurde der Agar für kurze Zeit im Dampftopf übersterilisiert bevor er in Petrischalen gegossen wurde. Die Zerstörung von Gentamicin durch die hohen Temperaturen ist nicht zu befürchten, da dieses Antibiotikum hitzestabil ist.

2. Agardiffusionstest mit Agarscheibchen

Bei einem weiteren Versuch wurden aus technischen Gründen Agarscheibchen anstatt Papierblättchen verwendet. Zuerst wurden D.S.T.-Agarplatten mit verschiedenen Konzentrationsstufen hergestellt (entsprechend dem Agarverdünnungstest). Danach wurden mit einem sterilen Messinghohlzylinder (lichte Weite = 9 mm) Agarscheibchen von den verschiedenen Konzentrationsstufen ausgestanzt. Mit einem sterilen, zugespitzten Holzstäbchen wurden diese Agarscheibchen auf beschickte D.S.T.-Agarplatten aufgebracht. Zur Umrechnung auf die betreffende Antibiotikummenge pro Agarscheibchen wurde die Masse des Agarscheibchens (75 mg) in Beziehung zur Gentamicin-Konzentration gesetzt.

Es gilt die Gleichung:

Antibiotikummenge = Antibiotikumkonzentration · Volumen des Agarscheibchens.

Bei der Berechnung wurde die Masse des Agarscheibchens dem Volumen gleichgesetzt.

3. "Handicap-Test" (ERICSSON,1960)

Es wurden eine Anzahl von Petrischalen mit D.S.T.-Agar jeweils mit demselben Teststamm beschickt. Einige dieser Petrischalen wurden verschieden lange bei 37°C bebrütet b e v o r Gentamicinblättchen auf die Agaroberfläche gelegt wurden. Der andere Teil der beschickten Petrischalen wurde unterschiedlich lange m i t aufgelegten Gentamicinblättchen bei 4°C im Kühlschrank gehalten, bevor die Petrischalen in den Brutschrank gestellt wurden. Die Diffusionszeit des Gentamicins im D.S.T.-Agar wird somit variiert und die damit verbundene Auswirkung auf den Hemmhofdurchmesser untersucht. Von jeder Spezies wurde ein Stamm getestet. Die Testblättchen waren jeweils mit 10 ug, 20 ug und 30 ug Gentamicin beschickt.

III. Ergebnisse

In den nachfolgenden Tabellen sind die Ergebnisse im einzelnen aufgeführt. Beim Agardiffusionstest und Agarverdünnungstest wurden jeweils drei Wiederholungsmessungen, beim Röhrchenverdünnungstest zwei Wiederholungsmessungen durchgeführt.

Tab. 2. Darstellung der Meßergebnisse des Agardiffusionstestes (Hemmhofdurchmesser in mm), sowie der minimalen Hemmkonzentration in ug/ml des Röhrchenverdünnungstestes (RVT) und des Agarverdünnungstestes (AVT) für die Spezies Pseudomonas aeruginosa.

Nährboden	D.S.T.-Agar			Mueller-Hinton-Agar			Normalagar			Minimale Hemmkonzentration in ug/ml:	
Blättchenbeschickung in ug	10	20	30	10	20	30	10	20	30	RVT Mueller-Hinton-Bouillon	AVT D.S.T.-Agar
Stamm											
Pyo I1	26	28	30	16	19	21	14	16	18	2	4
	25	29	30	16	19	21	13,5	16,5	19	2	16
	26,5	30	31	17	20	21,5	16	18	20		6
Pyo I2	29	31	33	20	23	25	18	21	23	1	1
	25	28	30	19	23	25	17,5	20	22	1	3
	28	31	32	21	23,5	26	18	21	23		4
Pyo I3	27	29	31	17	20	21	13	17	18	4	4
	23	25	27	15	18	20	11	15	17	4	16
	26,5	28	30	17,5	20	21,5	15	18	20		16
Pyo I4	29	32	32	21	23	24,5	16	19	20	2	2
	25	28	30	18	22	24	14	18	20	2	6
	29	30	32	21	23	25	18	20	22		6
Pyo I5	27	29	30	19	22	23	15	20	20	2	2
	26	28	30	17	20	22	14	18	20	2	8
	27,5	30	31	20	21	22,5	18	20	22		8
Pyo I6	27,5	29	31	19	23	24	16	17	20	2	2
	26	29	30	16	19	22	16	19	21	2	8
	29	30,5	31,5	20	21,5	23,5	19	21	23		8
Pyo I20	33	35	36	25	26	28	21	23	24,5	0,5	1
	28	32	33	21	25	26	17	21	23	1	2
	30	32	34	22	25,5	27	19	23	25		2
Pyo I27	31	33	34,5	20	22	25	17	20	22	1	1
	28	31	32	19	21,5	23,5	15	20	21	1	3
	30	32,5	34	20	23,5	25	16	20	23		3
Pyo I29	27	31	32	21	24	25	18	23	24	1	1
	28	30	31	20	22	24	17	21	23	0,5	3
	30	33	35	20	24	26	18,5	21	23		3
Pyo I32	33	35	36	24,5	26,5	28	21	23	24	0,5	1
	30	32	35	22	25	27	18	21	23	1	2
	29	32	32	18,5	21,5	23,5	17	20	20		3
Pyo I33	27	29	31	16	19	20	14	18	20	2	2
	25	28	30	17	20	22	14	18	20	2	8
	27	29	32	16	19,5	23	15	18	21,5		8
Pyo I34	32	34	35	25	26	27	19	21	22	0,5	1
	28	31	32	20	24	24	18	21	22	2	3
	28	31	32	20	22	23,5	18	20	21,5		3
Pyo I35	30	32	33	21	26	27	20	21	22	1	1
	28	30	31	22	25	27	16	20	22	1	3
	30	33,5	35	23,5	26	27,5	21	23,5	24,5		3
Pyo I36	28	30	32	21	23,5	25	18	21	23	2	2
	26	29	31	20	23	24	17	21	22	1	3
	28,5	31	32	19,5	22	25	16	19	22		3
Pyo I38	30,5	32	34	21	24	25	20	22	24,5	1	1
	28	31	32	19	22	24	16	20	22	1	3
	27,5	30	31,5	18,5	23	24,5	17,5	20	22		3

Fortsetzung zu Tab. 2

Nährboden	D.S.T.-Agar			Mueller-Hinton-Agar			Normalagar			Minimale Hemmkonzentration in ug/ml:	
Blättchenbeschickung in ug / Stamm	10	20	30	10	20	30	10	20	30	RVT Mueller-Hinton-Bouillon	AVT D.S.T.-Agar
Pyo I39	30,5	33	35	21	24	25	20	23	25	2	1
	28	31	32	20	23	25	18	20	22	1	3
	29	31	32	19,5	23	25	18	20,5	22		3
Pyo I40	28	30,5	32	22	22	24	18	20	22	2	3
	25	27	29	19,5	22,5	24	17	21	22	1	4
	27	29,5	31	18,5	22	24	17	20	21		3
Pyo I41	28	31	32	20	22	24	18	21	22	4	8
	24	28	29	18	22	24	16	20	21	4	6
	26	29,5	32	18,5	22	24,5	18	19,5	21		6
Pyo I42	30	31	33	21	23	24	20	22	23,5	1	3
	25	28	30	19	22	23,5	17	20	23	1	4
	28,5	30,5	32,5	19	21,5	24	18	20	22		3
Pyo I43	31	34	35	23	27	27	20	23	24	1	1
	29	32	33	21	24	26	17	21	22,5	1	3
	29	32,5	33,5	19,5	23	24,5	16	19,5	21		3
Pyo I44	32	35	36	23	26	27	21	23	24	1	1
	32	34	36	22	24	26	18	21	23	1	3
	31	32,5	34,5	22	25	26	18	20,5	22		3
Pyo II1	27,5	30	32,5	19	22	23,5	18	20	22	1	6
	25	28	31	16,5	19	22	16	19	21	2	8
	28	31	33	20,5	22,5	23,5	19	21	22,5		6
Pyo II2	29	31	33	21	24	26	19	21	23,5	1	2
	28	30	32	19	22	24	18	20	23	1	3
	28	31,5	33	21	24	25,5	18	20	22		4
Pyo II3	29	30,5	32	20,5	23	25	19	21	23	1	3
	26	29	31	19	22	23	16	20	22	1	4
	30	32	33	22	24	26	20	22	23		4
Pyo II4	31	33	34	24	27	29	22	24	26	1	2
	32	34	37	25	28	29	22	24	26	1	4
	32	35	36	24,5	27,5	30	24	26	29		3
Pyo II5	29	31	33	21	23	24,5	18	21	22	0,5	1
	29	31	33	22	25	26	17	21	23	0,5	4
	30	32,5	36	22	24,5	27	20	23,5	26		2
Pyo II6	27	29	30	14	17	18	13	16	18	2	2
	29	31	33	18	22	23	15	18	20	2	8
	27	29,5	31	15	19	21	18	20	22,5		6
Pyo II7	28,5	31	32,5	20	23,5	24	19	21	24	0,5	2
	27	30	32	18	22	23	17	20	22	1	3
	28	30	32	19	21,5	24	18	20,5	23		4
Pyo II8	29	32	33	18	22	23	14,5	17	19	1	2
	27	29	31	19	21	24	15	18	20	1	4
	26	29	31	18,5	22	23	18	21	22,5		4
Pyo II9	28	31	32	20	23	25	19	21	23	1	2
	27	29,5	32	18,5	21	23	16	20	21,5	1	4
	28	31	33	19,5	22	23,5	18	21	24		6
Pyo II 12	26	28	32	20	22	25	17,5	20	22	1	2
	28	31	33	20	23	25	19	21	24	1	6
	31	32,5	33,5	23	25	27,5	22,5	24	26		4

Fortsetzung zu Tab. 2

Nährboden	D.S.T.-Agar			Mueller-Hinton-Agar			Normalagar			Minimale Hemmkonzentration in ug/ml:	
Blättchenbeschickung in ug	10	20	30	10	20	30	10	20	30	RVT Mueller-Hinton-Bouillon	AVT D.S.T.-Agar
Stamm											
Pyo II 15	32	36	37	23	26	27	18	21	23	0,5	0,5
	31	34	36	23	25	28	19	22	25		2
	33	36	37,5	24,5	27	28	22,5	24	25		3
Pyo II 16	31	33	35	23	25	26	21	24	26	0,5	2
	32	35	36	23	26	27,5	20	23	25	0,5	2
	33	35	37	24,5	27	28	22,5	24	25		2
Pyo A1	23	26	28	14	17,5	19	16	18,5	21	4	2
	27	30	32	18	21	24	16	20	23	2	2
	25	27	29	15	17,5	20	14	16	19		3
Pyo A2	28	30	32	20	23	24	19	22	24	2	3
	27	31	32	20	23	25	19	22	24	2	4
	30	32,5	33	21	23	25	18	22	23,5		3
Pyo A9	26	30	31	19	22	24	16	19	20	2	4
	27	30	33	18	22	24	16	20	23	2	4
	27	30	33	18	20,5	23	17,5	20,5	23		6
Pyo A10	25	28,5	30	18	20	22	20	21	24	2	4
	26	29	30	17	20	23	16	21	21	1	4
	28,5	31	32	21	23	24	18	22	23,5		6
Pyo A11	31	33	36	22,5	25	27	21	23	26	0,5	2
	32	35	37	25	27	29	22	26	27	1	2
	30,5	33	35	22	24,5	27	20	23	24,5		3
Pyo A12	30	32	34	22	25	26	18	22	23	0,5	2
	31	33,5	35	22	25	26	19	22	23	1	3
	28,5	32	33	22	25	26,5	20	24	25,5		3
Pyo A13	30	34	35	21	26	28	21	24	25	0,5	3
	31,5	34	35	23	25	27	19,5	21	24	0,5	3
	30,5	33	34,5	22,5	25,5	27,5	22,5	26	27		3
Pyo A14	30	32	34	22	24	26	19	22	23,5	1	2
	30	32	33,5	22	25	26	18,5	21,5	23	2	3
	28	31	32	22	24	26	21	23	25,5		3
Pyo A15	27	28	30	18	20	22	15	19	20	2	2
	28	29,5	31	17	20,5	22	16	19	21	2	16
	26	28	29,5	17	20	22	17	20	22		12
Pyo A16	27	29	31	19	23	24	17	20	21	1	4
	28	30	31	19	21,5	24	17	20	21,5	2	6
	26,5	28	30,5	18,5	22	25	18	22	23,5		6
Pyo A18	25	28	29	20	21	23	17	21	23	1	2
	29	31	32	22	23	26	19	23	25	2	8
	28	31	32,5	20	23	25	18	21	23		4
Pyo A19	27	29	31	18	21	23	19	22	23	2	4
	28	30	31	18	21	23	16	19	21,5	2	8
	27	30	31	17,5	20	22,5	16	19,5	21		6
Pyo A31	27	31	31	20	23	26	20	23	25	1	2
	29	33	35	20	23,5	25	19	23	25	1	3
	30	33	35	21	25	27,5	19	22	24		3
Pyo A38	29	32	32	21,5	24,5	26,5	17	21	23	1	2
	29	32	32,5	21	23,5	25,5	17	19	22	1	3
	28,5	30,5	32	20	24	25	18	21	22,5		3

Tab. 3. Darstellung der Meßergebnisse des Agardiffusionstestes (Hemmhofdurchmesser in mm), sowie der minimalen Hemmkonzentration in ug/ml des Röhrchenverdünnungstestes (RVT) und des Agarverdünnungstestes (AVT) für die Spezies E s c h e r i c h i a c o l i .

Nährboden	D.S.T.-Agar			Mueller-Hinton-Agar			Normalagar			Minimale Hemmkonzentration in ug/ml:	
Blättchenbeschickung in ug / Stamm	10	20	30	10	20	30	10	20	30	RVT Mueller-Hinton-Bouillon	AVT D.S.T.-Agar
C1	31	33	34	27,5	29	30,5	29	31	32	0,5	3
	27	28	29	24	26	28	27	28	29	1	3
	28	29,5	30,5	24	26	27	27	30	31		3
C4	29	31	32,5	25	26	27,5	27	28	29,5	1	4
	25	26	27	23	24	25	24	26	27	1	6
	25	27	28	21	23	25	24	27	28,5		4
C7	30,5	32	33,5	27	28,5	29	28	30	30	1	4
	26	27	28	24	25	26	26	28	29	1	4
	27	29	30	23,5	25	26	26	27,5	29		4
C8	30	34	34	25	28	28,5	29	30,5	33	1	6
	27	30	31	22	24	25	29	30	31	1	6
	28	30	31,5	24	25,5	27	27	29	30		6
C10	28	29	31	25	26	27	29	31,5	34	2	4
	26	28	30	24	26	27	28	29	31	4	6
	28	29	30,5	23	26	27	29	31	31		6
C11	25	27	28,5	23	25	27	27	28	30	4	8
	26	26	27	23	25	25	23	24	25	2	6
	26	27	29,5	24	26	27	25	26	27		6
C12	25	27	27	22	24	25	27	28	30	4	4
	22	26	27	20	22	25	25	27	28	4	12
	25,5	28	28	21,5	24	25	26	27	28,5		6
C13	29	30	31	23,5	25	27	25	28	28	2	3
	25	28	28	22	23	25	25	26	27	1	4
	29	31	33	26	28	29	27	29	30		4
C14	26	28	29	25	26	27	28	31	32	2	4
	24	28	28	24	27,5	29	25	28	29	2	6
	27	29,5	30,5	25	26	27	27	28	29		3
C15	27	29	29	25	27	28	29	30	30	2	8
	27	29	30	24	26	26	25	26	27	1	8
	30	32	33	26	28	29	28	29,5	31		12
C16	26	28	28	25	27	27	28	29	31	4	12
	26	28	29	24	26	28	25	27	28	1	8
	31	32	33	27	28	29	29	30	31		12
C17	27	29	30	24	26	27	28	30	30,5	4	12
	26	29	30	25	27	28	27	29	31	2	12
	29	31	32	26	29	30	28	29	30		12
C18	28	29	29	26	27	28	29,5	31,5	32	2	4
	28	30	32	24	26	27	30	32	33	0,5	8
	29	31	32,5	27	28	29	27	29	29,5		6
C19	27	28	28	26	27	28	25	27	28	2	3
	25	27	28	23	25	26	27	29	30	1	4
	29	31	32	26	28	29	27	28,5	30		6

Fortsetzung zu Tab. 3

Nährboden	D.S.T.-Agar			Mueller-Hinton-Agar			Normalagar			Minimale Hemmkonzentration in ug/ml:	
Blättchenbeschickung in ug	10	20	30	10	20	30	10	20	30	RVT Mueller-Hinton-Bouillon	AVT D.S.T.-Agar
Stamm											
C20	27	29	30	24	27	28	28	29	30	4	4
	24	27	28	25	27	28	24	26	27	4	4
	26	29	29	26	28	28	27,5	28,5	29		6
C21	28	29	30	23	26	27	28	30	31	1	3
	26	27	29	24	26	27	26	28	29	1	3
	27	29,5	30	25	26	27	27	28	29		3
C22	17	18	20	17	18	20	12	15	18	128	128
	13	16	18	12	14	16	13	16	18	128	128
	15	17	20	14	18	20	16	18,5	20		128
C24	28	30	32	23	26	28	28,5	30	31	2	4
	27	29	30	23	24	25	27	29	29	1	6
	28	30	30,5	24	25	26	27	28	28		6
C25	27	29	30	24	26	26	28,5	29,5	30	2	6
	26	29	30	24	25	26	28	30	30	2	8
	27	28	29	23,5	25	26	27	28	28		6
C26	29	30	32	26	28	30	30	31	32	1	4
	27	29	31	25	26	26	27	28	30	1	4
	28,5	30	32	25	26,5	28	28	30	31		3
C27	29	30	32	26	28	28	29	31	32	1	3
	27	29	31	24	25	26	28	29	30	1	3
	28	29,5	30,5	26	27	28	27	28,5	30		3
C28	25	28	30	21	22	25	25	26	28	4	6
	24	27	29	24	25	26	28	29	30	2	6
	27	28	30	23,5	25	26	25	26,5	27		4
C29	28	30	31	24	26	26	27	28,5	30	2	4
	27	29	30	24	25	26	27	28	29	2	6
	28	30	30	24	26	27	26	27	28		4
C31	28	29	31	26	27	28	28	30	31	1	8
	26	27	28	23	25	26	27	29	29	2	6
	27	29	30	23,5	26	26	26	27,5	28		6
C32	31	32	33	25	27,5	29	28	29	30	1	6
	26	28	29	22	25	26	28	30	31	2	6
	27,5	29	29,5	24	26	27,5	26	27,5	28,5		4
C33	30,5	32	33	26	27,5	28	28	30	31	4	6
	26	28	29	23	25	27	28	30	31	2	6
	27	29	30	24,5	26,5	27	27	28	29		6
C36	28,5	30	32	24	26	27	25,5	27	28	2	4
	24	27	28	22	24	25	27	29	30	2	6
	26	27	29	23	24,5	26	25	27	28		6
C37	31	32	33	27	28	28,5	28	30	30	1	3
	27	29	30	25	27	28	27	30	31	1	4
	27	28,5	29,5	24	26	27	25	26	27,5		3
C38	29	30	31	25	27	28	28	29	30	2	4
	27	29	30	26	28	29	29	31	33	2	4
	24	25,5	27	24	26,5	28	24	26,5	27		6

Fortsetzung zu Tab. 3

Nährboden	D.S.T.-Agar			Mueller-Hinton-Agar			Normalagar			Minimale Hemmkonzentration in ug/ml:	
Blättchenbeschickung in ug	10	20	30	10	20	30	10	20	30	RVT Mueller-Hinton-Bouillon	AVT D.S.T.-Agar
Stamm											
C39	31	32	34	25	27	28	28	29	30	1	4
	25	27	29	24	26	27	28	30	31	2	4
	26	28	29	23	26	27	26	27	29		6
C50	28	30	30	23	25	26	28	29	31	1	6
	25	27	28	24	26	27	28	30	30	2	4
	25	27	28,5	20	23	25	24,5	26	26,5		4
C51	29	31	33	25	26	27	28	29	30	1	3
	26	28	29	25	27	28	29	31	32	2	8
	27	28	29	23	24,5	26	25	26	27,5		4
C52	30	31	32	26	27	29	29	30	31	1	4
	27	30	30	26	29	30	28	30	31	1	4
	26	28,5	29	24	25	26	26	28	29,5		4
C53	28	29	30	24	25	27	27	28	29	0,5	6
	26	28	29	24	25	27	27	29	30	1	3
	25	27,5	28	22	24,5	25,5	24	27	27,5		4
C54	29	30,5	31	26	27	28	28	30	30	0,25	2
	27	29	30	26	27	28	27	29	30	0,5	2
	27,5	29	30	24,5	26	27	27	28	29		2
C55	29	30,5	31	25	27	28	28	30	30	1	6
	25	27	28	24	26	27	29	30	31	1	4
	25	27	28,5	22	24,5	26	25	27	28		4
C56	27	30	30,5	25	27	28	28	29	30	1	4
	26	28	29	26	27	28	29	31	31	1	6
	25	28	29,5	23,5	24,5	26	26	27	28		4
C58	26	28	29	23	25	26	26	27	28	2	6
	26	28	29,5	23	25	26	25	28	29	2	6
	24	26	28	22,5	24,5	26,5	24,5	26,5	27,5		4
C59	29	31	32	26	26	27,5	28	29	30	1	1
	26	29	31	24	26	27	29	30	32	2	6
	27	29,5	30	24	26	27	27	28	29		6

Tab. 4. Darstellung der Meßergebnisse des Agardiffusionstestes (Hemmhofdurchmesser in mm), sowie der minimalen Hemmkonzentration in ug/ml des Röhrchenverdünnungstestes (RVT) und des Agarverdünnungstestes (AVT) für die Spezies Proteus mirabilis.

Nährboden	D.S.T.-Agar			Mueller-Hinton-Agar			Normalagar			Minimale Hemmkonzentration in ug/ml:	
Blättchenbeschickung in ug / Stamm	10	20	30	10	20	30	10	20	30	RVT Mueller-Hinton-Bouillon	AVT D.S.T.-Agar
B1	29	31	32,5	26	27	28	27	29	31	8	16
	26	28	29	27	28	29,5	27	29	30	2	16
	27	29	31	25	27	28	27	29	30		24
B2	29	31	33	27	28	29	28	29	31	4	16
	27	30	30	26	27	28	28,5	29,5	31	2	16
	27,5	30	31	25	27	28	27	29	29		16
B4	32	33	34	27	29	30	28	30	32	2	16
	27,5	30	31,5	27	28	30	29	31	32	1	16
	30	32	33	25	27	28	27,5	29	31		16
B10	28	30	31,5	25	26	28	26	28	29	4	16
	25	27	28	26	28	28	26	29	30	2	16
	26	28	30	25	25,5	27	24	26	27		16
B11	30	32	32	27	29	30	30	32	33	4	16
	27	29	30	25	28	29,5	28	31	31	2	16
	29	31	32	26	28	29	28,5	31	32		16
B14	28	30	31	24	26	27	25	27	28,5	4	16
	25	27	28	25	26	27	27	28	29	2	16
	26	28	29	24	26	28	23,5	26	27		24
B16	32	34	35	28	29	30	29	29	31	2	16
	27	29	30	25	27	28	29	30	31	2	12
	29	32	33	25	27	28	27	30	30		8
B17	26	28	30	25	27	28,5	24	26	28	8	32
	24	26	27,5	23	25	25	25	26	28	4	32
	24	26	28	22	24	25	22	24	26		24
B18	29	31	31	26	28	28,5	26,5	28	29	4	16
	27	29	30	26	27	28	29	30	30	2	16
	27,5	29,5	30,5	27	27	28	26	28	29,5		12
B19	28	31	32	27	29	30	29	30	30	8	16
	27	29	30	25	27	29	28	29	30,5	4	12
	27	29	30	24	25,5	28	25	28,5	29		16
B20	28	31	32	26	29	30,5	28	30	31	8	12
	26	28	30	27	27	31	28	29	30	4	12
	26	28,5	29,5	24,5	26,5	26,5	31	32,5	34		16
B21	29	31	32	26	28	29	27	28	29	8	12
	25	27	28	25	27	27	27	28	30	4	16
	28	30	31	25,5	28	29	28	31	31		16
B22	27	31	32	23	25	27	28	30	31	4	16
	26	29	30	23	25	27	27	29	30	4	16
	26,5	28	29	22	25	27	26	28	30		12
B23	30	32	32	28	28	30	29	31	32	4	12
	29	30	31	27	28	30	28	30	31	4	16
	29	30,5	31,5	26	28	29	29	32,5	32,5		16

Fortsetzung zu Tab. 4

Nährboden	D.S.T.-Agar			Mueller-Hinton-Agar			Normalagar			Minimale Hemmkonzentration in ug/ml:	
Blättchenbeschickung in ug	10	20	30	10	20	30	10	20	30	RVT Mueller-Hinton-Bouillon	AVT D.S.T.-Agar
Stamm											
B25	30	32	33	26,5	27	28	29	31	32,5	8	32
	28	30	31	25	28	29	29	31	32	8	24
	26	27,5	29,5	24	26	27	27,5	29	31		24
B26	25	27	29	24	27	29	26,5	28	29	4	16
	24,5	26,5	27,5	25	26	27	28	30	31	4	16
	25	27	28,5	23,5	26	28	26	28	28		16
B27	27	30	33	25	28	28	26	28	29	4	12
	27	29	30	26	28	29	30	32	33	8	12
	25,5	28	29,5	24	26	27	28	28	30		16
B28	29	31	32	25	27	28	27	29	30	4	12
	26	28	30	25	28	28	29	31	32	8	12
	28,5	30	31	26	28	28	31	33	34		16
B30	27	28	29	25	27	28	27	29	30,5	8	16
	26	28	29	26	28	28	30	31	31	4	16
	28,5	30	31	26	28	28,5	27	29	29		16
B31	27	28	31	26	27,5	28,5	29	30,5	31	8	16
	26	28	29	26	27	28	30	32	32	8	16
	27	29	30	25	27	28	26	28	29		24
B32	28	29,5	30	28	28,5	29,5	28	29	29,5	8	16
	26	29	29	28	29	30	30	32	34	4	16
	27	29	30,5	25	27	28	25	28	30		12
B33	28	29,5	29,5	25	27	28	30,5	33	34	8	12
	27	29	30	25	27	27	26	29	29	8	16
	27	28	30	24	25	26	26,5	27	29		12
B34	26	26,5	27,5	22	24	25	26	27	28	8	16
	25	26,5	27	26	26	27	28	29	30	8	16
	26	28	29	24	26	27	24	26	27		24
B35	24	25	27	23	25	26,5	27	28	29	8	32
	23	25	27	24	25	27	27	29	30	8	16
	24	26	28	23	25	26	25	27	29		24
B36	27	29	30	27	28	29	29	30	31	8	16
	26	28	30	27	29	31	30	34	34	8	16
	26,5	28,5	30	27	28	29	25	27	28		16
B37	27	28,5	29	24	26	26	28	29	30,5	16	16
	27	28	30	25	27	28	30	32	33	8	16
	26	28	30	23	24,5	26,5	25,5	28	30		16
B38	25	27	28,5	23	24	25	27	29	30	8	16
	25	27	29	25	27	28	27	30	30	4	16
	26,5	28	29,5	24,5	26	26,5	25	28	28,5		16
B39	27,5	29,5	31	26	28	29	28	29,5	30	4	16
	26	28	29	26	29	29	29	32	32	8	16
	27,5	28,5	30	23,5	26	27	26	28	28		12
B40	29	31	32	27	29	31	29	30	31	4	16
	27	29	30	26	28	29	30	33	33	4	16
	29	30	32	26	27	28	29,5	30,5	31,5		16

Fortsetzung zu Tab. 4

Nährboden	D.S.T.-Agar			Mueller-Hinton-Agar			Normalagar			Minimale Hemmkonzentration in ug/ml:	
Blättchenbeschickung in ug	10	20	30	10	20	30	10	20	30	RVT Mueller-Hinton-Bouillon	AVT D.S.T.-Agar
Stamm											
B42	28,5	30	32	28	30	31	29	30,5	31,5	4	16
	27	29	30	27	28	30	29	30	32	4	16
	28	29,5	30,5	26	28	29	28	30	31		12
B46	29	30	31	28	28	29,5	28,5	30	31	2	16
	27	29,5	30	25	27	29	30	31	32	4	16
	25	27,5	29	24	25,5	27	28,5	30,5	31,5		12
B48	28	30	31,5	27	28	29	29	29	30	2	16
	28	30	31	27	28	29	29	32	32	8	16
	27	28	29,5	25	27	28	26	28	29,5		16
B49	28	30	32	27	28	29	27	29,5	30	4	16
	27	29	31	27	29	30	30	32	33	4	16
	26	28	29,5	24	26	28	27	28,5	29,5		16
B50	28	29	31	27	28	30	28	29	31	4	16
	27	28	30	26	28	29	29	30	31	4	16
	28	30	31	26	27	29	27	29	29		16
B51	28	29	30	26,5	28	29	28,5	30	31	4	16
	26	28	30	25	27	28	29	31	32	8	16
	26	28	29	24	25	26,5	25	27	28		16
B53	28,5	30	31	28,5	28	30	28,5	30	31	2	16
	26	28	28	25	27	28	31	35	35	4	12
	26,5	30	30	24,5	26	27	26	28	29		16
B54	28,5	30	31	26	28	30	28	30	30	4	16
	26	29	30	27	29	31	30	32	33	8	16
	24	27	28	20	23	24,5	23,5	26	27		16
B55	29	30	31	26	28	29	29	30	31	2	16
	29	30	31	27	28	30	30	32	32	4	12
	27	29	30	23	25	27	27,5	30	31		16
B74	25	26	29	21	24	25	26	28	29,5	8	16
	24	26	29	22	25	26	29	31	32	8	16
	24,5	26,5	27	21	23,5	24,5	23	25	25		24

Tab. 5. Darstellung der Meßergebnisse des Agardiffusionstestes (Hemmhofdurchmesser in mm), sowie der minimalen Hemmkonzentration in ug/ml des Röhrchenverdünnungstestes (RVT) und des Agarverdünnungstestes (AVT) für die Spezies P r o t e u s v u l g a r i s .

Nährboden	D.S.T.-Agar			Mueller-Hinton-Agar			Normalagar			Minimale Hemmkonzentration in ug/ml:	
Blättchenbeschickung in ug	10	20	30	10	20	30	10	20	30	RVT Mueller-Hinton-Bouillon	AVT D.S.T.-Agar
Stamm											
D1	30	32	33	28	29	31	33	34,5	36	1	6
	27	29	30	25	27	28	27	28	29	1	12
	29,5	32	33	25	27	27	29	32	33,5		8
D2	21	24	26	19	21	23	24	27	29	4	12
	22	24	25	19	20	21	22	25	26	4	16
	22	25	27	18	20,5	22	20	22	24		24
D3	30,5	33	35	29	32	32	30	31	32	1	6
	28	30	31	27	30	30	28	29	31	1	8
	32	34	35	28	29	30	29	30,5	32		12
D4	29	31	33	25	27	28,5	28	30	30	2	8
	28	29	30	25	27	28	28	29	31	2	8
	29	31	32	25	27	28	27	30	30		12
D5	28,5	30	32	25	27	28,5	29	30	31	1	8
	28	30	31	26	28	29	31	32	32	2	8
	29	31	32	25	27	28	28	30	31		12
D6	30	32	34	26,5	28	29	27	29	30	2	8
	30	32	33	26	28	30	32	32	34	2	8
	30	32	33,5	27,5	29	31	28,5	30	31		12
D7	29	32	33	27	28,5	30	29	31	32	2	8
	31	32	34	26	28	29	28	30	31	2	12
	30	32	34	27	29	30	28,5	30	30,5		8
D8	30	31,5	33	28	30	31	28	29,5	30,5	2	8
	28,5	30,5	31,5	27	29	30	32	34	34	1	8
	30	32	34	27	28	29,5	28,5	30	31		6
D9	29	31	32,5	27	29	30	27	29,5	30,5	2	8
	27	29	31	27	28	29	32	34	35	2	12
	30	32	33	27	29	30	28	30	31		12
D10	31	32	33	27,5	29	30	28	30	31	2	6
	29	31	31	25	25	28	31	33	35	2	8
	29	31,5	32	26	27	28	27	28	29		12
D11	28	30,5	32	25	28	28,5	29	31	31	4	8
	27	30	30	26	28	29	30	35	35	2	8
	29	31,5	32,5	26,5	27	29	29	30	33		12
D13	30	32	33	28	29	30,5	30	31	32	2	8
	28	30	31	27	29	30	32	34	34	4	12
	30	32	33	27	28	29	28	29,5	31		8
D14	27	30	31	24,5	25	26	30	31	32	8	12
	25	28	29	24	26	28	30	31	32,5	4	16
	27,5	29	30	24	26	27	26	27	28		12
D15	28,5	30	31,5	24	29	30	29	31	32	8	8
	26	27	29	25	26	27	29	30	32	8	16
	28	30	31	25	26,5	27,5	25	27	28		12
D16	29	30,5	31,5	27	29	31	34	35	36	8	8
	26	29	29	26	28	29	30	32	33	4	16
	28,5	30,5	32	27	29	30	29	31	32		16

Tab. 6. Darstellung der Meßergebnisse des Agardiffusionstestes (Hemmhofdurchmesser in mm), sowie der minimalen Hemmkonzentration in ug/ml des Röhrchenverdünnungstestes (RVT) und des Agarverdünnungstestes (AVT) für die Spezies P r o t e u s r e t t g e r i .

Nährboden	D.S.T.-Agar			Mueller-Hinton-Agar			Normalagar			Minimale Hemmkonzentration in ug/ml:	
Blättchenbeschickung in ug	10	20	30	10	20	30	10	20	30	RVT Mueller-Hinton-Bouillon	AVT D.S.T.-Agar
Stamm											
E1	28	30	31	28	29	30	28	30	31	1	4
	26	29	30	26	28	28	27	28	29	2	8
	28	30	31	26	27,5	29	26	27,5	28		8
E2	28	29,5	30,5	29	29	30	26	28	29,5	2	8
	27	29	30	26	27	28	27	28	29	4	12
	28	29,5	30	26,5	28	29	26	28	28		12
E3	30	31,5	32,5	30	31	31	28	29,5	31	1	6
	28	30	30	27	30	30	29	30	31	2	8
	29,5	31	32	29	30	31	28	28,5	30		8
E4	28	31	31,5	29	30	32	27,5	31	31	2	6
	27	28,5	31	27	30	31	29	31	33	4	8
	29	30	31	28	30	32	29	31,5	32		8
E5	31	31	31	29	30	32	27	29	30,5	2	6
	28	29	30	27	29	31	28	31	31	4	8
	29	30	31	29	30	31	28	29	29,5		8
E6	23	25	27	25	27	28	27	29	30	8	32
	26	28	29	23	25	28	27	30	31	16	48
	23	26	28	23	26	27	25	26,5	28		24
E7	27,5	29	31	27,5	29	30	26	27	29	4	16
	26	29	29	27	28	30	24	26	28	16	48
	27	28,5	30	26,5	28,5	29	25	26	27		24
E8	29	31	31,5	31	32	31	26	29	30	1	4
	26	28	29	26	27	28	29	30	31	4	6
	29	30	31	29	30,5	31	28,5	31	31,5		6
E11	28	29,5	30,5	26	28	30	28	30	31	2	8
	28	30	32	27	28	30	29	31	31	2	6
	28	30	31	27	28	30	27,5	29	30		6
E13	25	26,5	28	25	27	28	26,5	27	29,5	16	16
	25	27	28	25	27	28	27	28	29	16	48
	25	27	28	25	26	27	23	26	27,5		24
E17	28,5	30	31	27	29	30	29	31	31	8	16
	28	29	31	27	29	30	31	32	32	8	16
	25,5	28	29	26,5	28	29	26	27,5	29		24
E18	31	33	34,5	29	30	31	29,5	32	32	2	12
	29	31	32	28	30	31	29	31	32	4	16
	30,5	32,5	33,5	27,5	29	31	28	30	30		12
E21	26	28	29	26	28	30	27	29	30	8	12
	27	28	29	24	26	27	31	32	34	8	12
	25,5	28	28	25,5	26	28	24	25	26		12
E22	23	26	27	23	25,5	27	27	29	30	16	32
	24	26	28	24	26	27	28	30	32	32	16
	24	25	26	22,5	24,5	26	22	24	25		48
E23	26,5	28	30	26	27	29	28	29	29	4	8
	26	29	30	24	26	28	30	30	32	8	12
	25	26	27	24	26	28	25	26	27		16
E24	26,5	27,5	29	24	26,5	28	28	29	30	4	8
	27	28,5	30,5	24	27	28	28	30	32	8	16
	24,5	26	27	22	25	25	24,5	25,5	27		16

Tab. 7. Darstellung der Meßergebnisse des Agardiffusionstestes (Hemmhofdurchmesser in mm), sowie der minimalen Hemmkonzentration in ug/ml des Röhrchenverdünnungstestes (RVT) und des Agarverdünnungstestes (AVT) für die Spezies Proteus morganii .

Nährboden	D.S.T.-Agar			Mueller-Hinton-Agar			Normalagar			Minimale Hemmkonzentration in ug/ml:	
Blättchenbeschickung in ug	10	20	30	10	20	30	10	20	30	RVT Mueller-Hinton-Bouillon	AVT D.S.T.-Agar
Stamm											
G1	29	32	33	28	29	30	27	29	29	0,5	2
	27	29,5	31	26	28	29	30	32	33	1	3
	30	32	33	27	28	29	26,5	28,5	29		2
G2	30	33	33	26	28,5	29,5	30	34	38	1	4
	30	32	33	27	29	31	29	32	34	1	4
	30	32	33	27	28	29	34	38	38		6
G3	28	30	31,5	25	27	28	27	29	30	1	3
	28	30	31	26	28	29	32	33	33	1	2
	29	31	31	25	27	29	29	29	31		4
G4	29	32	33	26	29	30	30	32	33	1	3
	31	32	33	27	28	30	35	36	37	1	4
	31,5	32	34	28	29	30	29	32	32		6
G5	30	32	33	26	28	29,5	27	29	30	1	4
	28	30	32	26	27	28	26	28	29	1	4
	30	32	33	26,5	28	29	32	33	33		6
G8	28	30	31,5	26	28,5	29	25	27	30	1	6
	26	28	29	26	28	30	27	29	30	2	4
	28,5	30,5	32	26	27	28	27	31	31		3
G9	31	32	33,5	27,5	28,5	30	35	37	37	1	4
	31	33	34	27	29	30	31	32	33	2	4
	31	34	35	28	29,5	30	34	36	38		4
G10	27,5	29	31	26	27,5	28,5	30	32	33	1	3
	28	30	31	26	28	30	29	32	32	0,5	4
	27	29	30,5	26,5	27,5	29	28,5	30	34		4
GIV	32,5	34	35,5	29	31	32	34	35	36	0,5	2
18	31	33	34	27	28	30	34	34	35	0,5	2
	28	31	32	25	28,5	29	31	33,5	33		2
GIV	32	33	34	29	30,5	31	33	35	37	1	3
27	31	32	34	26	28	29	32	34	35	0,5	2
	32,5	34	35	28	28,5	30	35	35	37		2
GIV	29,5	32	33,5	28	29	30	32	33	34	1	3
29	27	28	29	24	26	28	32	33	35	0,5	3
	29	30	31,5	27	29	29	29	32	32		4
GIV	29	31	32	27	28	29	29	30	30	1	4
30	28	29	30	25	27	28	3o	31	33	1	6
	28,5	30	31	27	29	29	31	32	33		6
GTy	32	33,5	35	27	28,5	30,5	29	30	32	1	3
99	29	31	32	27	28	30	31	34	34	1	3
	30	33	33	27	28	29,5	28,5	30	31		3
GVa	29,5	33	33	26	29	29	41	42	43	1	4
2109	30	32	33	27	29	29	33	36	36	0,5	6
	32	33	34	28	29	31	29	31	32		3
GIV	29	31	32	27	28,5	29	31	32	33	0,5	1
9	28	30	31	26	27	28	29	31	33	1	4
	30	31	32,5	29	30	30,5	27	29	31		4

Tab. 8. Darstellung der Meßergebnisse des Agardiffusionstestes (Hemmhofdurchmesser in mm), sowie der minimalen Hemmkonzentration in ug/ml des Röhrchenverdünnungstestes (RVT) und des Agarverdünnungstestes (AVT) für die Spezies K l e b s i e l l a A e r o b a c t e r .

Nährboden	D.S.T.-Agar			Mueller-Hinton-Agar			Normalagar			Minimale Hemmkonzentration in ug/ml:	
Blättchenbeschickung in ug	10	20	30	10	20	30	10	20	30	RVT Mueller-Hinton-Bouillon	AVT D.S.T.-Agar
Stamm											
H1	25	27	28	21	23	25	26	28,5	29	2	12
	23	26	27	19	21	22	24	26	27	4	16
	25	27,5	29	22	24	25	26	28	29		16
H2	30	30	31	25	26	28	29	31	31,5	0,5	1
	26	28	29	24	25	26	27	29	30	0,5	1,5
	28	30	31,5	24	26	28	27	29,5	30		1,5
H3	28	30	31	25	26,5	27	29	30,5	32	0,5	1
	26	28	29	22	24	25	27	29	30	0,5	1
	28,5	30	31	24,5	26	27	25,5	28	28		1,5
H4	27	28,5	30	24,5	25,5	27	27	27,5	28	0,5	1
	26	28	29	24	25	26	26	27	28	0,25	1,5
	27,5	29	30	24,5	26,5	27	24,5	26	27,5		1,5
H5	29	30,5	32	25	27	28	31	33	34	0,5	1
	28	30	31	24	26	27	28	29	30	0,25	1
	28	30,5	31	25	27	27	27	28,5	29		1
H6	29	30	31	25	27	28	28	29	30	0,25	2
	26	28	28	22	24	26	23	25	27	0,5	1,5
	27	28	30	24	26	26	26	27,5	28		2
H7	29	31	32	26	27	28	30,5	30	32	0,5	1,5
	26	29	29	22	23,5	25	23	25	26	0,25	1
	27	29	30	24	26	26	26	27,5	28,5		1,5
H8	29	30	32	25,5	26	27	29	31	32	0,25	1
	25	28	29	22	24	25,5	24	25	27	0,25	1
	28	30	31	24	26	27	26	27,5	29		1
H11	26,5	29	30	23	24	25	29	29	31	0,25	1,5
	25	26	27	20	22	24	24	26	27	0,25	1
	26	28	28	23	24,5	25,5	24	26	26		1
H12	28	30	31	24	25	26	28,5	30	31	0,25	1
	28	30	30	25	26	28	28	28	31	0,25	1
	27	29	30	23	26	26	26	27	28		1
H13	28	30	31	24	26	26	29	30	31	0,25	1
	28	30	32	25	27	28	28	29	30	0,5	1
	28	30	31	24	26	27	26	27	28		1
H14	33	34	36	26	28	29	23	26	28	0,5	1,5
	30	32	35	23	25	27	22	25	25	0,5	2
	30	33,5	35	25	28	29	20	23	24		3
H15	27	30	31	25	26	27	28	30	31	0,5	1,5
	26	28	29,5	24	25	27	26	27	28	0,5	1,5
	27	29	29	23	25	26	25	27	28		1,5
H16	29	30	32	25	27	28	30	31	32	0,25	1
	29	31	31	24	27	27	27	29	30	0,25	1
	28	30,5	32	25	26	27	26	27	28		1
H17	32,5	34	35	28	30	31	33	34	36	0,25	1
	32	34	35	26	28	30	33	35	37	0,25	1
	30,5	32	33,5	27	29	30	30	31	33		1
H19	30	32	33	27	28	29	30	32	33	0,25	1
	27	29	30	24	26	27	28	29	30	0,5	1
	29	30	31	25	27	27	26	28	29		1
H20	28	29,5	31	23	25	26	28,5	29,5	30	0,25	1
	26	29	29	22	24	26	26	28	29	0,5	1
	27	29	29	22,5	25	26	25	27	27		1

In der Tab. 9 und der Abb. 1 ist die pH-Abhängigkeit der Hemmhofdurchmesser auf den verschiedenen Agarsorten dargestellt. Alle Kurven verlaufen im neutralen pH-Bereich besonders flach. Dabei haben die Kurven beim Penassay-Seed-Agar mit allen untersuchten Stämmen den gestrecktesten Verlauf. Am wenigsten gestreckt sind die Kurven auf D.S.T.-Agar.

In der Tab. 10 sind die Ergebnisse des modifizierten Agardiffusionstestes dargestellt. Als Testblättchen wurden ausgestanzte Gentamicin-Agarscheibchen aus dem Agarverdünnungstest verwendet. Der Umrechnungsfaktor von der Gentamicinkonzentration auf die entsprechende Gentamicinmenge pro Agarscheibchen beträgt $\frac{10}{133}$. In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, daß Agarscheibchen, die mit 10 ug, 20 ug und 30 ug Gentamicin beschickt waren, einen nur geringfügig größere Hemmhofdurchmesser als gleichermaßen beschickte Papierblättchen zeigten. Da auch das Volumen des Papierblättchens demjenigen des Agarscheibchens ungefähr entsprach (Durchmesser 9 mm, Höhe 2 mm), erscheint die aufgezeigte Beziehung zwischen Antibiotikumkonzentration und Antibiotikummenge auch auf die Papierblättchen anwendbar. Somit würde ein mit 10 ug Gentamicin beschicktes Papierblättchen einer Gentamicinkonzentration von 133 ug/ml entsprechen. Die Abb. 2 zeigt, daß praktisch eine funktionelle Beziehung zwischen Agarscheibchenkonzentration und Hemmhofdurchmesser aufgestellt werden kann. Pro Verdünnungsstufe nimmt der Hemmhofdurchmesser um 3 mm zu.

Penassay-Seed-Agar:	pH	5,4	6,0	6,4	6,6	6,8	7,0	7,4	7,8	8,2	8,4	9,0	9,3
Spezies	Stamm												
E.coli	C14	9,3	10,5	11,0	13,8	-	16,5	22,3	27,6	30,2	-	33,6	-
Pr.mirabilis	B36	-	10,8	-	15,3	-	18,6	24,0	30,0	32,3	-	38,5	-
Pr.morganii	G1	-	14,2	-	17,5	-	21,2	26,5	32,5	35,6	-	39,0	-
Klebs.Aerob.	H17	12,2	13,6	-	16,3	-	20,0	26,0	33,2	38,0	-	45,5	-
Ps.aeruginosa	PII15	13,3	14,6	-	14,6	-	18,0	21,0	23,5	23,5	-	27,6	-
D.S.T.-Agar:													
E.coli	C14	-	-	25,0	-	25,6	-	29,0	31,5	-	33,0	31,8	-
Pr.mirabilis	B36	-	-	25,2	-	26,6	-	30,2	32,6	-	33,6	33,6	-
Pr. morganii	G1	-	-	31,5	-	31,6	-	34,2	36	-	38,8	43	-
Klebs.Aerob.	H17	-	-	32,6	-	32,5	-	35,0	38,8	-	41,6	-	-
Ps.aeruginosa	PII15	-	-	31,8	-	34,0	-	36,0	37,0	-	36,5	-	-
Normalagar:													
E.coli	C14	13,5	16,3	18,6	-	22,8	-	26,8	28,0	30,5	-	-	35,3
Pr.mirabilis	B36	-	15,5	19,5	-	26,8	-	32,2	34,5	37,0	-	-	-
Pr.morganii	G1	-	18,8	22,0	-	29,0	-	31,6	36,5	-	-	-	-
Klebs.Aerob.	H17	22,2	22,2	23,5	-	28,8	-	34,0	37,3	42,2	-	-	-
Ps.aeruginosa	PII15	-	17,2	18,0	-	19,2	-	20,6	21,3	21,6	-	25,2	-
Mueller-Hinton-Agar:													
E.coli	C32	11,0	16,5	18,5	-	-	25,0	28,2	29,2	-	29,3	28,6	-
Pr.mirabilis	B11	11,0	19,3	22,0	-	-	28,3	31,2	31,8	-	31,6	32,0	-
Pr.morganii	GIV27	16,6	21,8	23,0	-	-	28,2	29,8	30,5	-	30,6	31,0	-
Klebs.Aerob.	H15	14,0	19,3	20,0	-	-	26,0	28,2	30,5	-	30,0	31,0	-
Ps.aeruginosa	P A18	15,2	20,6	21,8	-	-	25,3	27,0	26,6	-	28,6	24,6	-

Tab. 9 Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers in mm vom pH-Wert bei verschiedenen Agarnährböden. Die Zahlen sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen.

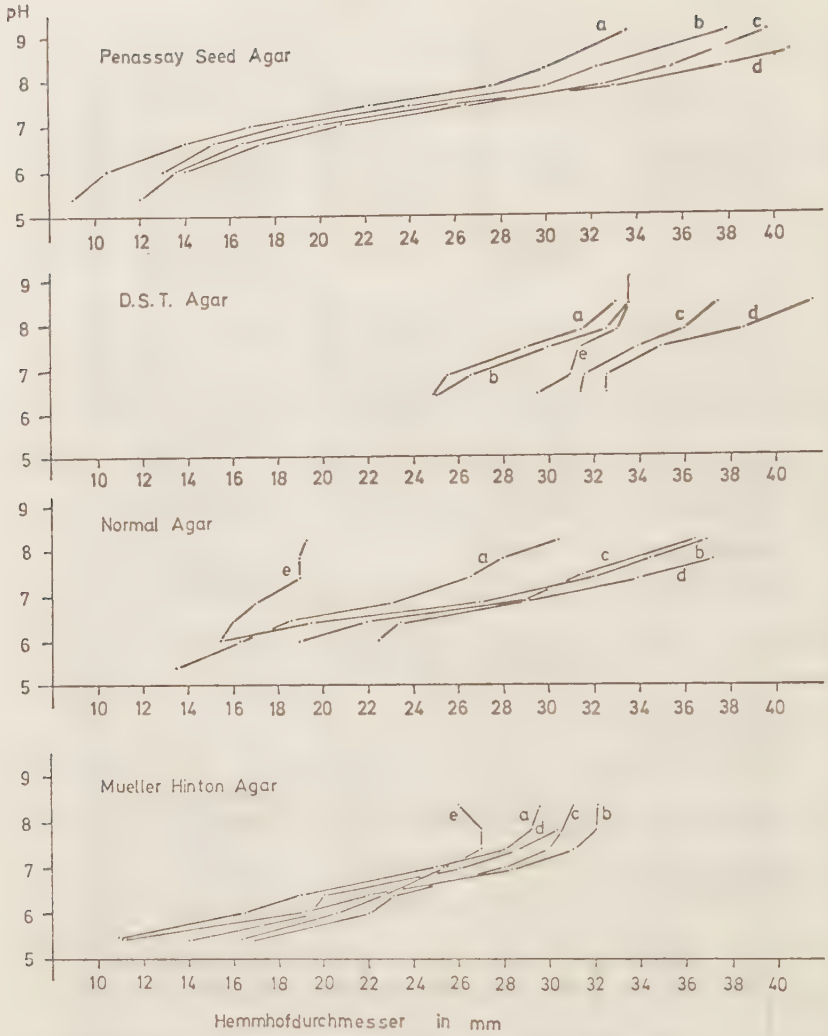

Abb. 1 Graphische Darstellung der Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers vom pH-Wert des betreffenden Agars entsprechend den Meßwerten aus Tab. 9
Die einzelnen Kurven entsprechen jeweils einer anderen Spezies.
a) E.coli, b) Proteus mirabilis, c) Proteus morganii,
d) Klebsiella Aerobacter, e) Pseudomonas aeruginosa
Mittelwert aus 3 Messungen

	Agarscheibchen						Papierblättchen
menge in ug pro Agarscheibchen	0,15	0,3	0,6	1,2	2,4	4,8 ug	10 ug
Gentamicinkonzentration in ug pro Agarscheibchen	2	4	8	16	32	64 ug/ml	(= 133 ug/ml)

Spezies	Stamm							
Pseudomonas	A14	11	15	18,5	21,5	24	27	29,5
aeruginosa	A18	12	16	19	21,5	24	27	27,5
Proteus	B11	10	13	14,5	17	21	23	28,5
mirabilis	B36	10	12	14	17,5	21,5	24,5	26,5
E.coli	C14		11	15	18	20	23	25,5
	C32		13	15	18	21	22,5	28
Proteus	D12		13	17	20,5	24	27	30
vulgaris	D14		12,5	15,5	18,5	21	23	26,5
Proteus	E14			11	14	18	21	25,5
rettgeri	E19			11	14,5	19	23	24,5
Proteus	GIV7	10	14	17	19	22	25	29
morganii	GIV27	11	17	20	23	24,5	27	32,5
Klebsiella	H15	12	15	17	18,5	23	24	26,5
Aerobacter	H17	11	16	22,5	25	28	33	32

Tab.10 Darstellung der Hemmhofdurchmesser in mm beim modifizierten Agardiffusionstest mit ausgestanzten Gentamicin-D.S.T.-Agarscheibchen

Die rechte Spalte zeigt die Hemmhofdurchmesser aus dem Agardiffusionstest mit einer Blättchenbeschickung von 10 ug zum Vergleich.

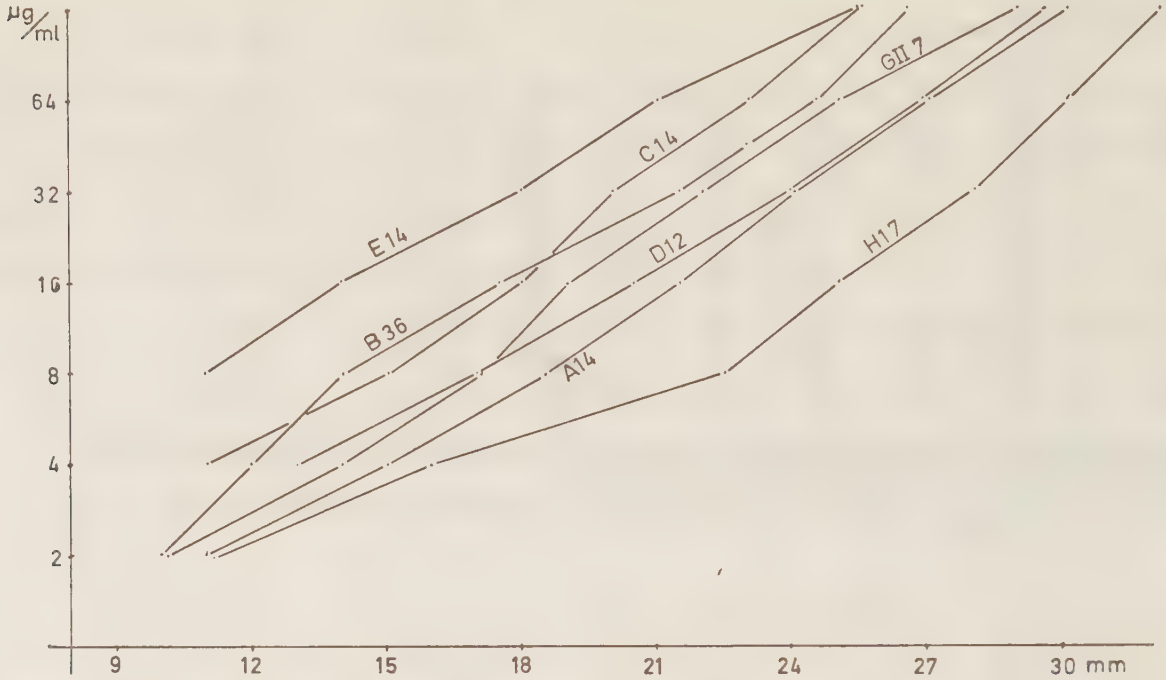

Abb. 2 Graphische Darstellung der Beziehung zwischen Hemmhofdurchmesser und Agarscheibchen mit verschiedenen Gentamicinkonzentrationen halblogarithmisch dargestellt. Die Meßwerte sind der Tab.10 entnommen. Die Linien sind mit dem untersuchten Stamm jeweils gekennzeichnet.

Spezies	Stamm	Zeit t	Prädiffusionszeit (im Kühlschrank) -5h	-4h	-3h	-2h	-1h	0	Präinkubationszeit (im Brutschrank bei 37°C) +1h	+2h	+3h	+4h	+5h
Proteus mirabilis	B 5	10 µg	30	29	29	29	27	26,5	25	23	22	18	
		20 µg	33	32	31,5	31,5	29	27,5	26	24	22	19	~14
		30 µg	33	33	32	32	31	30	27	25	22	20	
Proteus vulgaris	D 12	10 µg	30	29	28	28,5	28	26	25	23	19	16	
		20 µg	32	31	30,5	31	29,5	28	27	25	20	18,5	~14
		30 µg	33,5	32,5	32	32	31,5	30	28	26	21	20	
E.coli	C 14	10 µg	27,5	27	25	26	25	23,5	23	21	17	14	
		20 µg	30	29	28	28	27	25	24	23	18	16	~14
		30 µg	31,5	30	29,5	29	28	26	26	23	19	17	
Proteus morganii	G 1	10 µg	34,5	32	32	32	32	29,5	28	26	21,5	19	18
		20 µg	36,5	34	33,5	33,5	33	31	30	27	23	21	19
		30 µg	37,5	35	35	34	34	32	31	29	24	22	20
Pseudomonas aeruginosa	II 15	10 µg	34	32	32	32	31	30	29	28	26	25	24
		20 µg	37	36	35	34	34,5	33	32	30	28	26,5	25
		30 µg	39	36,5	36,5	35,5	36	34	34	31,5	29	28	26,5
Klebsiella-Aerobacter	H 17	10 µg	35,5	34	31,5	33	31,5	30	29	27	22	24	21
		20 µg	38	37	35	35	33,5	32	31,5	28	24	24	22
		30 µg	39	37,5	35	36	35	34,5	32,5	30	25	25	22
Proteus rettgeri	E 9	10 µg	32	31,5	29,5	29,5	29	27,5	26	24	19	18	17
		20 µg	35	33,5	32	32	31	29	28	26	21	19	18
		30 µg	36	34	33	33	32	30	29	28	22	20	19

Tab.11 "Handicap-Test" für Gentamicin auf D.S.T.-Agar.
Abhängigkeit der Hemmhofdurchmesser von der Präinkubationszeit und der Prädiffusionszeit.
Auf der linken Seite darf das Antibiotikum entsprechende Zeit vordiffundieren bevor die Keimvermehrung beginnt. Auf der rechten Seite beginnt die Keimvermehrung im Brutschrank bevor die Testblättchen aufgelegt werden. Bei 0 werden die beschickten Agarplatten gleich nach dem Auflegen der Blättchen in den Brutschrank gestellt.

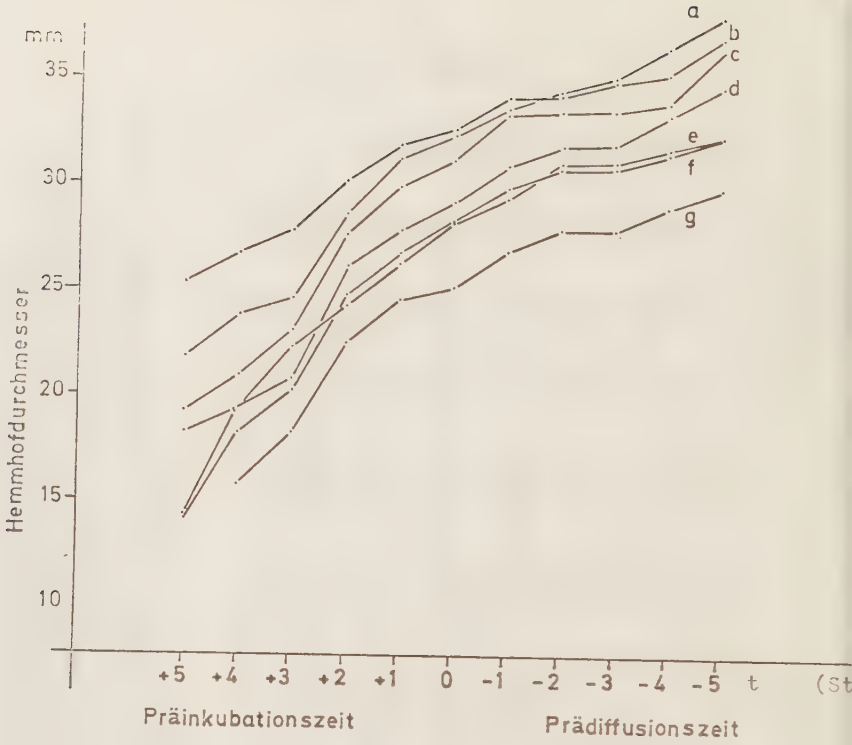

Abb.3 "Handicap-Test" für Gentamicin auf D.S.T.-Agar. Graphische Darstellung der Abhängigkeiten der Hemmhofdurchmesser (Mittelwert aus 3 Bestimmungen) bei variierender Gentamicindiffusionszeit. Die Meßwerte sind der Tab.11 entnommen.
Jede Kurve stellt einen Stamm dar: a)H17 (1), b) PyoII15 (2), c) G1 (4), d) E9 (8), e) B5 (16), f) D12 (12), g) C14 (4)

Die Zahlen in Klammern stellen die minimalen Hemmkonzentrationswerte des betreffenden Stammes im Agarverdünnungstest dar.

IV. Biometrische Auswertung

1. Varianzanalyse

Um den Einfluß der verschiedenen Faktoren (Agarsorte, Beschickung, Spezies und Stamm) auf die Untersuchungsergebnisse, also die Hemmhofdurchmesser, quantitativ zu erfassen und zu prüfen, ob dieser Einfluß von wesentlicher Bedeutung ist, wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Dabei wurden Nährboden, Blättchenbeschickung mit Gentamicin und Bakterienspezies als feste, die Stämme innerhalb der Spezies als zufällige Faktoren behandelt. Da in der Hemmhoftheorie (COOPER, 1955) die Fläche und nicht der Hemmhofdurchmesser in die Zusammenhänge zwischen Antibiotikumdiffusion und Hemmhofentstehung eingeht, wurden die Werte der Hemmhofdurchmesser quadriert.

Als Modell diente:

$$x_{\alpha\beta\gamma\delta j} = \mu + f^{A}_{\alpha} + f^{B}_{\beta} + f^{C}_{\gamma} + m^{D}_{\gamma\delta} + f^{AB}_{\alpha\beta} + f^{AC}_{\alpha\gamma} + f^{BC}_{\beta\gamma} + m^{AD}_{\alpha\gamma\delta} + m^{BD}_{\beta\gamma\delta} + f^{ABC}_{\alpha\beta\gamma} + m^{ABD}_{\alpha\beta\gamma\delta} + z_{\alpha\beta\gamma\delta j}$$

Erläuterung der Symbole:

$x_{\alpha\beta\gamma\delta j}$ der einzelne Meßwert (= Quadrat des Hemmhofdurchmessers bei Agar α, Beschickung β, Spezies γ, Stamm δ und Messung j)

μ Gesamtmittelwert

f^{A}_{α} Nährbodenwirkung

$\mathcal{S}^{B}_{\beta}$	Wirkung der Beschickung
$\mathcal{S}^{C}_{\gamma}$	Spezieswirkung
$m^{D}_{\gamma\delta}$	Stammwirkung (Stamm δ ist jeweils einer Spezies γ untergeordnet,
$\mathcal{S}^{AB}_{\alpha\beta}$	Wechselwirkung zwischen Nährboden und Beschickung
$\mathcal{S}^{AC}_{\alpha\gamma}$	Wechselwirkung zwischen Nährboden und Spezies
$\mathcal{S}^{BC}_{\beta\gamma}$	Wechselwirkung zwischen Beschickung und Spezies
$m^{AD}_{\alpha\gamma\delta}$	Wechselwirkung zwischen Nährboden und Stamm
$m^{BD}_{\beta\gamma\delta}$	Wechselwirkung zwischen Beschickung und Stamm
$\mathcal{S}^{ABC}_{\alpha\beta\gamma}$	Wechselwirkung zwischen Nährboden, Beschickung und Spezies
$m^{ABD}_{\alpha\beta\gamma\delta}$	Wechselwirkung zwischen Nährboden, Beschickung und Stamm
$z_{\alpha\beta\gamma\delta j}$	zufällige Wirkung aller weiteren Einflüsse (Versuchsfehler)

Es wird u.a. vorausgesetzt, daß die Zufallsvariablen $m^{D}_{\gamma\delta}$, $m^{AD}_{\alpha\gamma\delta}$, $m^{BD}_{\beta\gamma\delta}$, $m^{ABD}_{\alpha\beta\gamma\delta}$, $z_{\alpha\beta\gamma\delta j}$ normal verteilt sind mit Erwartungswert o und konstanten (d.h. für alle Werte der Indices $\alpha, \beta, \gamma, \delta, j$ gleichen) Varianzen $\sigma_D, \sigma_{AD}, \sigma_{BD}, \sigma_{ABD}$ und σ. Die Gültigkeit dieser Modellvoraussetzung wurde jeweils mit Hilfe des Cochran-Testes überprüft.

Die Streuungszerlegung zeigte, daß alle untersuchten Faktoren Agar, Beschickung, Spezies und Stamm (innerhalb einer Spezies) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% signifikante Unterschiede in den Hemmhofdurchmessern bewirken. Ferner bestehen signifikante Wechselwirkungen zwischen Agar und Spezie Agar und Stamm (innerhalb einer Spezies), Agar und Beschickung sowie zwischen Beschickung und Spezies.

1. Einfluß der Agarsorte

Vergleicht man die Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser aller Spezies für jede Agarsorte getrennt, so sind die Mittelwerte beim D.S.T.-Agar am größten und beim Mueller-Hinton-Agar am kleinsten. Die Mittelwerte beim Normalagar liegen dazwischen.

2. Einfluß der Beschickung

Diese Unterschiede waren zu erwarten und stellen somit keine Besonderheit dar.

3. Einfluß der Spezies

Werden die Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser für jede Spezies berechnet und untereinander verglichen, so ergeben sich signifikante Unterschiede, die im einzelnen in der Tab.12 dargestellt sind.

Tab.12 Multipler Vergleich der Mittelwerte nach Scheffé. Die signifikanten Unterschiede beim simultanen Vergleich der Mittelwerte aller Spezies sind mit S gekennzeichnet.

Spezies / Spezies	E.coli	Prot. mirab.	Prot. vulg.	Prot. rettg.	Prot. morg.	Klebs.-Aerob.
Pseudomonas aeruginosa	S	S	S	S	S	S
E.coli		-	S	-	S	-
Proteus mirabilis			-	-	S	-
Proteus vulgaris				-	-	-
Proteus rettgeri					S	-
Proteus morganii						S

Auffällig sind die signifikanten Unterschiede aller Spezies gegenüber Pseudomonas aeruginosa. Ferner bestehen signifikante Unterschiede zwischen E.coli und Proteus vulgaris, E.coli und Proteus morganii, Proteus morganii und Proteus mirabilis, Proteus morganii und Proteus rettgeri sowie zwischen Proteus morganii und Klebsiella-Aerobacter.

In der Tab. 13 ist die Rangfolge der Spezies bei Betrachtung der Mittelwerte der quadrierten Hemmhofdurchmesser dargestellt. Dabei sind die Mittelwerte von Pseudomonas aeruginosa am kleinsten, diejenigen von Proteus morganii am größten.

Tab. 13. Rangfolge der Spezies bei Betrachtung der Mittelwerte der quadrierten Hemmhofdurchmesser.

Spezies:	Mittelwert der quadrierten Hemmhofdurchmesser:
1. Pseudomonas aeruginosa	625,5
2. E.coli	755,8
3. Klebsiella-Aerobacter	776,7
4. Proteus mirabilis	804,9
5. Proteus rettgeri	810,3
6. Proteus vulgaris	859,7
7. Proteus morganii	934,4

4. Einfluß der Stämme (innerhalb einer Spezies)

Es wurden die Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser für die einzelnen Stämme innerhalb einer Spezies ermittelt und miteinander verglichen.

Tab. 14 In der Tabelle sind neben den Mittelwerten der Hemmhofdurchmesser für jede Spezies jeweils der Mittelwert des resistentesten und des empfindlichsten Stammes angegeben.

Spezies	Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser aus 9 Bestimmungen	Mittelwert des resistentesten Stammes	Mittelwert der Spezies	Mittelwert des empfindlichsten Stammes	Streubreite der Mittelwerte
Pseudomonas aeruginosa	459	625	833	374	
E.coli	(283) 659	755	848	189 (565)	
Proteus mirabilis	662	804	933	271	
Proteus vulgaris	532	859	944	312	
Proteus rettgeri	680	810	941	261	
Proteus morganii	814	934	1055	241	
Klebsiella-Aerobacter	647	776	1021	374	

E.coli weist die größte Streubreite der Hemmhofdurchmesser auf und Proteus morganii die kleinste. Vernachlässigt man einen "Ausreißer" bei E.coli, so hätte diese Spezies die kleinste Streubreite und Pseudomonas aeruginosa und Klebsiella-Aerobacter die größten. Dieses Ergebnis ist mit einigem Vorbehalt zu betrachten, da die einzelnen Spezies verschieden große Stichprobenumfänge besitzen und somit bei kleineren Stichprobenumfängen weniger "Ausreißer" vorhanden sind.

5. Wechselwirkung zwischen Agar und Beschickung

Es wurden die Mittelwerte aller untersuchten Stämme für die jeweilige Agarsorte und die entsprechende Blättchenbeschickung ermittelt und untereinander verglichen. Die Ergebnisse werden in der Tab. 15 aufgeführt.

Tab. 15 Mittelwerte aller Hemmhofdurchmesser für die einzelne Blättchenbeschickung und die einzelnen Agarsorten gesondert berechnet. Die Zunahme der Hemmhofdurchmesser bei steigender Beschickung ist als Differenzbetrag gekennzeichnet.

Blättchenbeschickung in ug	10	Differenz-betrag	20	Differenz-betrag	30
Nährboden					
D.S.T.-Agar	769	120	889	77	966
Mueller-Hinton-Agar	576	97	673	69	742
Normalagar	658	99	759	68	827

Somit zeigen die Mittelwerte auf dem D.S.T.-Agar bei jeweils gleicher Beschickung den größten Wert, während der Mueller-Hinton-Agar die niedrigsten Werte besitzt. Die Werte beim Normalagar stehen dazwischen. Die unterschiedlichen Differenzbeträge entsprechen einer unterschiedlichen Zunahme der Hemmhofdurchmesser. Auf D.S.T.-Agar ist die Zunahme der Hemmhofdurchmesser bei steigender Blättchenbeschickung größer als auf Mueller-Hinton-Agar und Normalagar.

6. Wechselwirkung zwischen Agar und Spezies

Hier wurden die Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser für jede Spezies und für jede Agarsorte berechnet und miteinander verglichen. Die Resultate sind in Tab. 16 dargestellt.

Tab. 16 Darstellung der Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser bezüglich der einzelnen Spezies und der verschiedenen Agarsorten.

Agarsorte / Spezies	D.S.T.-Agar	Mueller-Hinton-Agar	Normalagar
Pseudomonas aeruginosa	940	513	424
E.coli	812	657	798
Proteus mirabilis	832	725	858
Proteus vulgaris	913	751	915
Proteus rettgeri	822	780	828
Proteus morganii	972	795	1037
Klebsiella-Aerobacter	870	655	805

Die Spezies Pseudomonas aeruginosa, E.coli und Klebsiella-Aerobacter haben auf dem D.S.T.-Agar, alle Proteus Spezies haben auf dem Normalagar ihren höchsten Mittelwert. Pseudomonas aeruginosa hat auf Normalagar den niedrigsten, alle anderen Spezies haben auf Mueller-Hinton-Agar ihren niedrigsten Wert.

7. Wechselwirkung zwischen Beschickung und Spezies

Hier wurden die Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser innerhalb der Spezies und den drei Gentamicinbeschickungen errechnet und miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Tab. 17 dargestellt.

Tab. 17 Darstellung der Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser bezüglich Spezies und Gentamicinbeschickung. Zur Erläuterung der Wechselwirkung zwischen Spezies und Beschickung wurde die Differenz zur nächst höheren Gentamicinbeschickung jeweils errechnet.

Blättchenbeschickung in ug	10	Differenzwert	20	Differenzwert	30
Spezies					
Pseudomonas aeruginosa	510	128	638	90	728
E.coli	672	95	767	61	828
Proteus mirabilis	716	99	817	66	883
Proteus vulgaris	766	106	872	70	942
Proteus rettgeri	726	94	820	65	885
Proteus morganii	841	106	947	69	1016
Klebsiella-Aerobacter	693	95	788	69	849

Bei zunehmender Beschickung ist die Zunahme des Hemmhofdurchmessers bei Pseudomonas aeruginosa am größten, danach folgen die Spezies Proteus vulgaris und Proteus morganii, dann Proteus mirabilis und am kleinsten ist die Hemmhofzunahme bei E.coli, Proteus rettgeri und Klebsiella-Aerobacter.

8. Wechselwirkung zwischen Agar und Stamm (innerhalb der Spezies).

Es wurden die Mittelwerte bezüglich der drei Agarsorten und der jeweiligen Stämme innerhalb einer Spezies errechnet und untereinander verglichen. Zur Erläuterung der Wechselwirkung zwischen Agar und Stamm innerhalb einer Spezies sind in der nachfolgenden Tab. 18 jeweils die Differenzbeträge der untersten und obersten Mittelwerte der einzelnen Stämme innerhalb einer Spezies getrennt für jeden Agar wiedergegeben.

Tab. 18 Darstellung der Differenzbeträge aus dem niedrigsten und höchsten Mittelwert der einzelnen Stämme innerhalb einer Spezies für jede Agarsorte getrennt.

Nährboden / Spezies	D.S.T.-Agar	Mueller-Hinton-Agar	Normalagar
Pseudomonas aeruginosa	454	391	356
E.coli	645 (255)	446 (188)	656 (241)
Proteus mirabilis	318	271	303
Proteus vulgaris	453	466	458
Proteus rettgeri	369	266	235
Proteus morganii	238	100	492
Klebsiella-Aerobacter	405	324	550

Man sieht, daß die Streuung der einzelnen Meßwerte innerhalb einer Spezies auf den drei Nährböden sich unterschiedlich verhält. Bei Proteus vulgaris ist die Differenz bei allen drei Agarsorten etwa gleich groß, bei Proteus morganii ist die Differenz beim D.S.T.-Agar und Mueller-Hinton-Agar deutlich kleiner als beim Normalagar, während die Differenz bei Pseudomonas aeruginosa und Proteus rettgeri beim Mueller-Hinton-Agar und Normalagar deutlich kleiner ist als beim D.S.T.-Agar. Vernachlässigt man einen resistenten Keim bei E.coli (Zahlen in Klammer) so ist die Streuung der Einzelstämme bei allen drei Agarsorten gering.

2. Regressionsanalyse

Es stellt sich jetzt die Frage nach dem Zusammenhang zwischen dem Hemmhofdurchmesser und der minimalen Hemmkonzentration. Besteht überhaupt eine Abhängigkeit zwischen den beiden Meßwerten, von welcher Art ist er und kann man die minimale Hemmkonzentration aus dem Hemmhofdurchmesser schätzen? Weiterhin wäre noch wichtig zu wissen, ob sich bei den verschiedenen Agar-

sorten Unterschiede in dieser sogenannten stochastischen Abhängigkeit ergeben?

Studien über die Hemmhoftheorie (ERICSSON 1954, COOPER 1955) haben gezeigt, daß die Diffusion eines Antibiotikums in einem festen Nährboden einer Exponentialkurve folgt. Es wurde versucht eine Beziehung zwischen Hemmhofdurchmesser und der minimalen Hem konzentration herzustellen, indem man die Werte der Hemmhofdurch messer quadratisch, und die Werte der minimalen Hemmkonzentratio exponentiel (^{2}log) senkrecht zueinander aufzeichnete. Aus diesem Grunde wurden bei der Berechnung der Regressionsanalyse die Werte der minimalen Hemmkonzentrationen in Zweierlogarithmen transformiert. Somit gilt: $y^\circ = {}^2\log y \quad x^\circ = x^2$.

Zu beachten ist, daß dem x° eine Dreifachbestimmung, dem y° eine Zweifachbestimmung beim Röhrchenverdünnungstest, eine Drei- fachbestimmung beim Agarverdünnungstest zugrunde liegt. Zusätz- lich wurden beim Agarverdünnungstest Zwischenverdünnungen her- gestellt, so daß diese Ergebnisse von vornherein genauer sind als jene des Röhrchenverdünnungstestes. Es wurde für jede Be- schickung, also 10 ug, 20 ug und 30 ug und für jeden Agar die Korrelationskoeffizienten sowie die entsprechenden Regressions- geraden und, falls sich ein signifikanter Zusammenhang ergab, die Vertrauensbereiche der Regressionsgeraden (Konfidenzhyperbel bestimmt. Der Korrelationskoeffizient r zwischen x° und y°, der unter gewissen Umständen ein Maß für die Strammheit des Zusammen hanges zwischen x° und y° darstellt, ist in den nachfolgenden Übersichtstabellen jeweils angegeben. Die beigefügte Wahrschein- lichkeitsangabe p kennzeichnet das Signifikanzniveau, mit welche die Hypothese, daß der wahre Korrelationskoeffizient (und damit die Steigung der wahren Regressionsgeraden) 0 sei, zu verwerfen wäre.

Tab.19 Übersicht über die Regressionsanalyse

Betrachtung der minimalen Hemmkonzentration (gemessen in Mueller-Hinton-Bouillon) bezüglich Hemmhofdurchmesser für jede Beschickung und jeden Agar getrennt.

x° = Mittelwert aus 3 Bestimmungen (Hemmhofdurchmesser, transf. x^2)
y° = Mittelwert aus 2 Bestimmungen (MHK Bouillon) bzw. 3 Bestimmungen (MHK Agar) transf. $^2\log y$
r = Korrelationskoeffizient
p = Signifikanzniveau
y = Gleichung der Regressionsgeraden

Agarnährboden / Spezies	Blättchenbeschick. in ug	D.S.T.-Agar	Mueller-Hinton-Agar	Normalagar
Ps. aeruginosa ($\bar{y}^\circ$=0,223)	10	r=-0,726 (p<<0,001) y= 3,268 -0,0038x° ($\bar{x}^\circ$=799)	r=-0,697 (p<<0,001) y= 1,907 -0,0042x° ($\bar{x}^\circ$=399)	r=-0,643 (p<<0,001) y= 1,759 -0,0048x° ($\bar{x}^\circ$=317)
	20	r=-0,727 (p<<0,001) y= 3,456 -0,0034$\bar{x}^\circ$ ($\bar{x}^\circ$=948)	r=-0,714 (p<<0,001) y= 2,222 -0,0038x° ($\bar{x}^\circ$=520)	r=-0,672 (p<<0,001) y= 2,220 -0,0046x° ($\bar{x}^\circ$=430)
	30	r=-0,743 (p<<0,001) y= 3,812 -0,0034x° ($\bar{x}^\circ$=1048)	r=-0,694 (p<<0,001) y= 2,376 -0,0036x° ($\bar{x}^\circ$=604)	r=-0,662 (p<<0,001) y= 2,393 -0,0043x° ($\bar{x}^\circ$=509)
E.coli ($\bar{y}^\circ$=0,498)	10	r=-0,842 (p<<0,001) y= 5,911 -0,0075x° ($\bar{x}^\circ$=721)	r=-0,774 (p<<0,001) y= 5,557 -0,0087x° ($\bar{x}^\circ$=578)	r=-0,775 (p<<0,001) y= 5,328 -0,0067x° ($\bar{x}^\circ$=719)
	20	r=-0,824 (p<<0,001) y= 6,19 -0,0069x° ($\bar{x}^\circ$=826)	r=-0,721 (p<<0,001) y= 5,715 -0,0078x° ($\bar{x}^\circ$=666)	r=-0,794 (p<<0,001) y= 5,929 -0,0067x° ($\bar{x}^\circ$=808)
	30	r=-0,808 (p<<0,001) y= 6,613 -0,0069x° ($\bar{x}^\circ$=891)	r=-0,751 (p<<0,001) y= 6,718 -0,0086x° ($\bar{x}^\circ$=725)	r=-0,751 (p<<0,001) y= 6,033 -0,0064x° ($\bar{x}^\circ$=867)
Pr. mirabilis ($\bar{y}^\circ$=1,54)	10	r=-0,557 (p <0,001) y= 4,103 -0,0035x° ($\bar{x}^\circ$=731)	r=-0,391 (0,05<p<0,01 y= 3,343 -0,0028x° ($\bar{x}^\circ$=641)	r=-0,151 (p >0,2) y= 2,326 -0,0010x° ($\bar{x}^\circ$=764)
	20	r=-0,605 (p <0,001) y= 4,481 -0,0035x° ($\bar{x}^\circ$=837)	r=-0,346 (0,05<p<0,01 y= 3,534 -0,0027x° ($\bar{x}^\circ$=730)	r=-0,144 (p >0,2) y= 2,310 -0,0009x° ($\bar{x}^\circ$=871)
	30	r=-0,556 (p <0,001) y= 4,788 -0,0036x° ($\bar{x}^\circ$=911)	r=-0,426 (0,01<p<0,001 y= 3,972 -0,0031x° ($\bar{x}^\circ$=796)	r=-0,155 (p >0,2) y= 2,458 -0,0010x°)$\bar{x}^\circ$=929)

Fortsetzung zu Tab.19

Spezies	Agarnährboden / Blättchenbeschick. in ug	D.S.T.-Agar	Mueller-Hinton-Agar	Normalagar
Pr. vulgaris ($\bar{y}^o$=0,878)	10	r=-0,565 (0,05>p>0,01) y= 3,465 -0,0032x° ($\bar{x}^o$=807)	r=-0,459 (0,1>p>0,05) y= 2,719 -0,0028x° ($\bar{x}^o$=665)	r=-0,226 (p>0,2) y= 1,98 -0,0013x° ($\bar{x}^o$=825)
	20	r=-0,584 (0,05>p>0,01) y= 3,933 -0,0033x° ($\bar{x}^o$=927)	r=-0,428 (0,2>p>0,1) y= 2,691 -0,0024x° ($\bar{x}^o$=760)	r=-0,222 (p>0,2) y= 2,113 -0,0013x° ($\bar{x}^o$=926)
	30	r=-0,609 (0,05>p>0,01) y= 4,223 -0,0033x° ($\bar{x}^o$=1004)	r=-0,397 (0,2>p>0,1) y= 2,743 -0,0023x° ($\bar{x}^o$=826)	r=-0,213 (p>0,2) y= 2,193 -0,0013x° ($\bar{x}^o$=993)
Pr. rettgeri ($\bar{y}^o$=1,52)	10	r=-0,811 (p<0,001) y= 6,673 -0,0070x° ($\bar{x}^o$=734)	r=-0,757 (p<0,001) y= 6,905 -0,0048x° ($\bar{x}^o$=697)	r=-0,582 (0,05>p>0,01) y= 8,641 -0,0061x° ($\bar{x}^o$=745)
	20	r=-0,825 (p<0,001) y= 7,313 -0,0054x° ($\bar{x}^o$=833)	r=-0,741 (0,01>p>0,001) y= 7,041 -0,0048x° ($\bar{x}^o$=787)	r=-0,534 (0,05>p>0,01) y= 7,245 -0,0047x° ($\bar{x}^o$=839)
	30	r=-0,796 (p<0,001) y= 7,781 -0,0050x° ($\bar{x}^o$=899)	r=-0,694 (0,01>p>0,001) y= 7,326 -0,0047x° ($\bar{x}^o$=857)	r=-0,485 (0,1>p>0,05) y= 7,525 -0,0046x° ($\bar{x}^o$=899)
Pr. morganii ($\bar{y}^o$=1,155)	10	r=-0,117 (p>0,2) y= 0,294 -0,0005x° ($\bar{x}^o$=870)	r=-0,308 (p>0,2) y= 1,048 -0,0010x° ($\bar{x}^o$=714)	r=-0,349 (p>0,2) y= 0,849 -0,0007x° ($\bar{x}^o$=936)
	20	r=-0,093 (p>0,2) y= 0,252 -0,0003x° ($\bar{x}^o$=986)	r=-0,388 (0,2>p>0,1) y= 2,136 -0,0019x° ($\bar{x}^o$=803)	r=-0,279 (p>0,2) y= 0,589 -0,0005x° ($\bar{x}^o$=1051)
	30	r=-0,102 (p>0,2) y= 0,288 -0,0003x° ($\bar{x}^o$=1057)	r=-0,283 (p>0,2) y= 2,342 -0,0019x° ($\bar{x}^o$=867)	r=-0,267 (p>0,2) y= 0,512 -0,0004x° ($\bar{x}^o$=1122)
Klebs. Aerobacter ($\bar{y}^o$=9,38)	10	r=-0,435 (0,1>p>0,05) y= 1,058 -0,0026x° ($\bar{x}^o$=775)	r=-0,551 (0,05>p>0,01) y= 1,587 -0,0024x° ($\bar{x}^o$=578)	r=-0,350 (0,2>p>0,1) y= 1,005 -0,0018x° ($\bar{x}^o$=726)
	20	r=-0,377 (0,2>p>0,1) y= 1,019 -0,0017x° ($\bar{x}^o$=985)	r=-0,502 (0,05>p>0,01) y= 1,658 -0,0026x° ($\bar{x}^o$=666)	r=-0,230 (p>0,2) y= 0,344 -0,0011x° ($\bar{x}^o$=912)
	30	r=-0,293 (p>0,2) y= 0,577 -0,0011x° ($\bar{x}^o$=949)	r=-0,456 (0,1>p>0,05) y= 1,664 -0,0025x° ($\bar{x}^o$=721)	r=-0,287 (p>0,2) y= 0,276 -0,0010x° ($\bar{x}^o$=875)

Tab.20 Übersicht über die Regressionsanalyse
Betrachtung der minimalen Hemmkonzentration (gemessen mit dem Agarverdünnungstest) bezüglich Hemmhofdurchmesser für jede Beschickung und jeden Agar getrennt.

x^o = Mittelwert aus 3 Bestimmungen (Hemmhofdurchmesser, transf. x^2)
y^o = Mittelwert aus 2 Bestimmungen (MHK Bouillon) bzw. 3 Bestimmungen (MHK Agar) transf. lg y
r = Korrelationskoeffizient
p = Signifikanzniveau
y = Gleichung der Regressionsgeraden

Agar-nährboden / Spezies	Blättchen-beschick. in ug	D.S.T.-Agar	Mueller-Hinton-Agar	Normalagar
Ps. aeruginosa ($\bar{y}^o$=1,189)	10	r=-0,695 (p<<0,001) y= 3,864 -0,0033x^o ($\bar{x}^o$=799)	r=-0,664 (p<<0,001) y= 2,660 -0,0037x^o ($\bar{x}^o$=399)	r=-0,522 (p<0,001) y= 2,333 -0,0036x^o ($\bar{x}^o$=317)
	20	r=-0,716 (p<<0,001) y= 4,113 -0,0031x^o ($\bar{x}^o$=948)	r=-0,692 (p<<0,001) y= 2,968 -0,0034x^o ($\bar{x}^o$=520)	r=-0,558 (p<0,001) y= 2,713 -0,0035x^o ($\bar{x}^o$=430)
	30	r=-0,685 (p<<0,001) y= 4,229 -0,0029x^o ($\bar{x}^o$=1048)	r=-0,662 (p<<0,001) y= 3,075 -0,0031x^o ($\bar{x}^o$=604)	r=-0,559 (p<0,001) y= 2,872 -0,0033x^o ($\bar{x}^o$=509)
E.coli ($\bar{y}^o$=1,65)	10	r=-0,744 (p<<0,001) y= 5,04 -0,0047x^o ($\bar{x}^o$=721)	r=-0,726 (p<<0,001) y= 5,060 -0,0059x^o ($\bar{x}^o$=578)	r=-0,722 (p<<0,001) y= 4,885 -0,0045x^o ($\bar{x}^o$=719)
	20	r=-0,737 (p<<0,001) y= 5,308 -0,0044x^o ($\bar{x}^o$=826)	r=-0,680 (p<<0,001) y= 5,186 -0,0053x^o ($\bar{x}^o$=666)	r=-0,734 (p<<0,001) y= 5,257 -0,0045x^o ($\bar{x}^o$=808
	30	r=-0,737 (p<<0,001) y= 5,657 -0,0045x^o ($\bar{x}^o$=891)	r=-0,712 (p<<0,001) y= 5,888 -0,0058x^o ($\bar{x}^o$=725)	r=-0,708 (p<<0,001) y= 5,398 -0,0043x^o ($\bar{x}^o$=867)
Pr. mirabilis ($\bar{y}^o$=2,77)	10	r=-0,455 (0,01>p>0,001) y= 3,612 -0,0011x^o ($\bar{x}^o$=731)	r=-0,392 (0,05>p>0,01) y= 3,498 -0,0011x^o ($\bar{x}^o$=641)	r=-0,532 (p<0,001 y= 3,881 -0,0015x^o ($\bar{x}^o$=764)
	20	r=-0,511 (0,01>p>0,001) y= 3,768 -0,0012x^o ($\bar{x}^o$=837)	r=-0,441 (0,01>p>0,001) y= 3,792 -0,0014x^o ($\bar{x}^o$=730)	r=-0,515 (0,01>p>0,001) y= 3,875 -0,0013x^o ($\bar{x}^o$=871)
	30	r=-0,447 (0,01>p>0,001) y= 3,821 -0,0011x^o ($\bar{x}^o$=911)	r=-0,429 (0,01>p>0,001) y= 3,756 -0,0012x^o ($\bar{x}^o$=796)	r=-0,436 (0,01>p>0,001) y= 3,809 -0,0011x^o ($\bar{x}^o$=929)

Fortsetzung zu Tab.20

Agar-nährboden / Spezies	Blättchen-beschick. in ug	D.S.T.-Agar	Mueller-Hinton-Agar	Normalagar
Pr. vulgaris ($\bar{y}$=2,29)	10	r=-0,872 (p<<0,001) y= 3,678 -0,0017x° ($\bar{x}$°=807)	r=-0,765 (p<0,001) y= 3,358 -0,0016x° ($\bar{x}$°=665)	r=-0,572 (0,05>p>0,01) y= 3,259 -0,0012x° ($\bar{x}$°=825)
	20	r=-0,863 (p<<0,001) y= 3,860 -0,0017x° ($\bar{x}$°=827)	r=-0,725 (0,01>p>0,001) y= 3,358 -0,0014x° ($\bar{x}$°=760)	r=-0,569 (0,05>p>0,01) y= 3,389 -0,0012x° ($\bar{x}$°=926)
	30	r=-0,852 (p<<0,001) y= 3,917 -0,0016x° ($\bar{x}$°=1004)	r=-0,731 (0,01>p>0,001) y= 3,485 -0,0014x° ($\bar{x}$°=826)	r=-0,541 (0,05>p>0,01) y= 3,453 -0,0012x° ($\bar{x}$°=993)
Pr. rettgeri ($\bar{y}$=2,50)	10	r=-0,693 (0,01>p>0,001) y= 5,609 -0,0042x° ($\bar{x}$°=734)	r=-0,653 (0,01>p>0,001) y= 5,679 -0,0028x° ($\bar{x}$°=697)	r=-0,621 (0,05>p>0,01) y= 7,383 -0,0042x° ($\bar{x}$°=745)
	20	r=-0,662 (0,01>p>0,001) y= 5,833 -0,0031x° ($\bar{x}$°=833)	r=-0,629 (0,01>p>0,001) y= 5,792 -0,0028x° ($\bar{x}$°=787)	r=-0,569 (0,05>p>0,01) y= 6,670 -0,0034x° ($\bar{x}$°=839)
	30	r=-0,610 (0,05>p>0,01) y= 5,955 -0,0027x° ($\bar{x}$°=899)	r=-0,605 (0,05>p>0,01) y= 6,033 -0,0028x° ($\bar{x}$°=857)	r=-0,549 (0,05>p>0,01) y= 7,120 -0,0035x° ($\bar{x}$°=899)
Pr. morganii ($\bar{y}$=1,22)	10	r=-0,207 (p>0,2) y= 1,913 -0,0008x° ($\bar{x}$°=870)	r=-0,359 (0,2>p>0,1) y= 2,889 -0,0014x° ($\bar{x}$°=714)	r=-0,079 (p>0,2) y= 1,501 -0,0002x° ($\bar{x}$°=936)
	20	r=-0,211 (p>0,2) y= 1,969 -0,0006x° ($\bar{x}$°=986)	r=-0,299 (p>0,2) y= 3,314 -0,0017x° ($\bar{x}$°=803)	r=-0,033 (p>0,2) y= 1,226 -0,0000x° ($\bar{x}$°=1051)
	30	r=-0,256 (p>0,2) y= 2,147 -0,0006x° ($\bar{x}$°=1057)	r=-0,329 (p>0,2) y= 3,781 -0,0020x° ($\bar{x}$°=867)	r=-0,047 (p>0,2) y= 1,148 -0,0000x° ($\bar{x}$°=1122)
Klebs. Aerobacter ($\bar{y}$=0,32)	10	r=-0,428 (0,1>p>0,05) y= 2,544 -0,0029x° ($\bar{x}$°=775)	r=-0,588 (0,05>p>0,01) y= 3,199 -0,0028x° ($\bar{x}$°=578)	r=-0,419 (0,1>p>0,05 y= 2,846 -0,0023x° ($\bar{x}$°=726)
	20	r=-0,373 (0,2>p>0,1) y= 2,511 -0,0019x° ($\bar{x}$°=885)	r=-0,523 (0,05>p>0,01) y= 3,378 -0,0030x° ($\bar{x}$°=666)	r=-0,334 (0,2>p>0,1) y= 2,239 -0,0016x° ($\bar{x}$°=812)
	30	r=-0,281 (p>0,2) y= 1,987 -0,0012x° ($\bar{x}$°=940)	r=-0,469 (0,1>p>0,05) y= 3,363 -0,0029x° ($\bar{x}$°=721)	r=-0,344 (p>0,2) y= 2,017 -0,0013x° ($\bar{x}$°=875)

In den Abb.4 bis 6 sind die Punktewolken, welche die Beziehung zwischen minimaler Hemmkonzentration und Hemmhofdurchmesser darstellen, für alle Spezies auf den drei Agarsorten aufgezeichnet. Wie aus diesen graphischen Darstellungen zu ersehen ist, sind deutliche Lageunterschiede der einzelnen Spezies vorhanden. Würden diese Lageunterschiede bei der statistischen Berechnung nicht berücksichtigt werden, so würde ein Korrelationseffekt erzielt, der die Korrelationsverhältnisse innerhalb der Spezies völlig verändern könnte. Aus diesem Grunde wurde die Regressionsanalyse für jede Spezies getrennt durchgeführt. Wird der Lageunterschied der Punktewolken von Pseudomonas aeruginosa auf Normalagar und Mueller-Hinton-Agar vernachlässigt, so liegen alle Hemmhofdurchmesser über 20 mm. Die dazugehörigen minimalen Hemmkonzentrationen im Röhrchenverdünnungstest gemessen, bewegen sich zwischen 0,5 ug/ml und darunter bis 4 ug/ml.

In den Abb. 7 bis 9 wurden die Regressionsgeraden mit den dazugehörigen Konfidenzhyperbeln, welche das 95%-Vertrauensband der Regressionsgeraden darstellen, graphisch am Beispiel von Pseudomonas aeruginosa und E.coli aufgezeichnet. Auf D.S.T.-Agar wurden der Übersicht wegen die Konfidenzhyperbeln weggelassen. Wie aus Abb.9 zu entnehmen ist, rücken die beiden Regressionsgeraden sehr nahe zusammen. Die Prüfung auf Linearität der Regressionsgeraden konnte nicht durchgeführt werden, da die Gesamtzahl der y-Werte nicht größer ist als die Anzahl der x-Werte. Die Punktewolken bringen jedoch die Linearität deutlich zum Ausdruck.

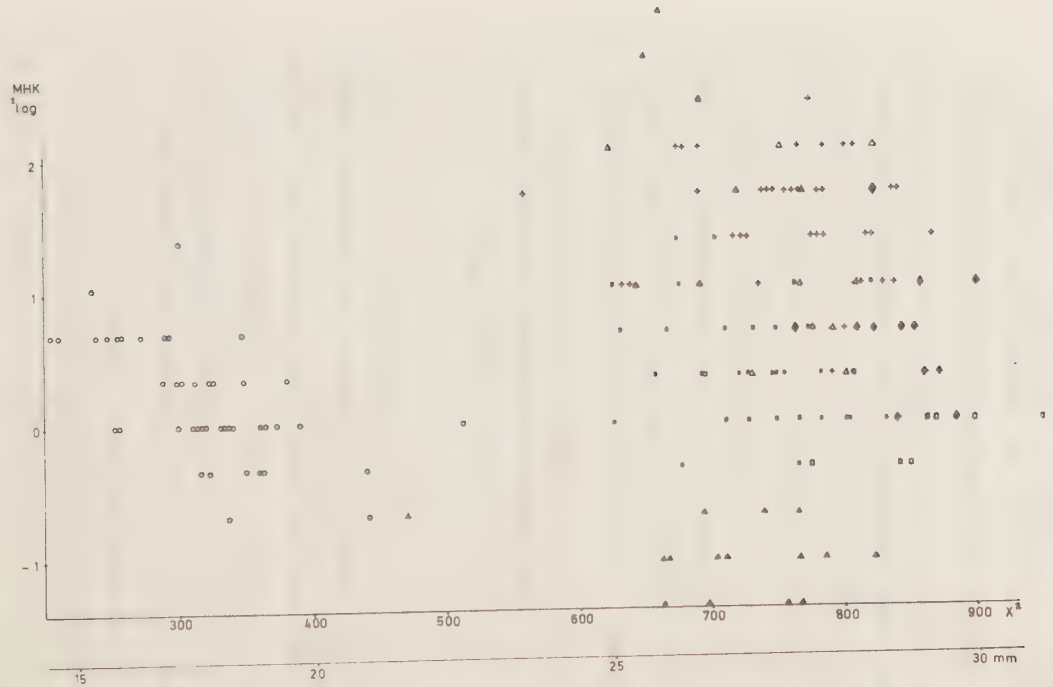

Abb.4 Beziehungen zwischen den minimalen Hemmkonzentrationen (Mittelwert aus 2 Bestimmungen gemessen in Mueller-Hinton-Bouillon) und den zugehörigen Hemmhofdurchmessern (Mittelwert aus 3 Bestimmungen gemessen auf Normalagar mit 10 ug Gentamicintestblättchen) bei den Spezies: o Pseudomonas aeruginosa, ■ E.coli, + Proteus mirabilis, ◆ Proteus vulgaris, △ Proteus rettgeri, ▲ Klebsiella Aerobacter, ◘ Proteus morganii.

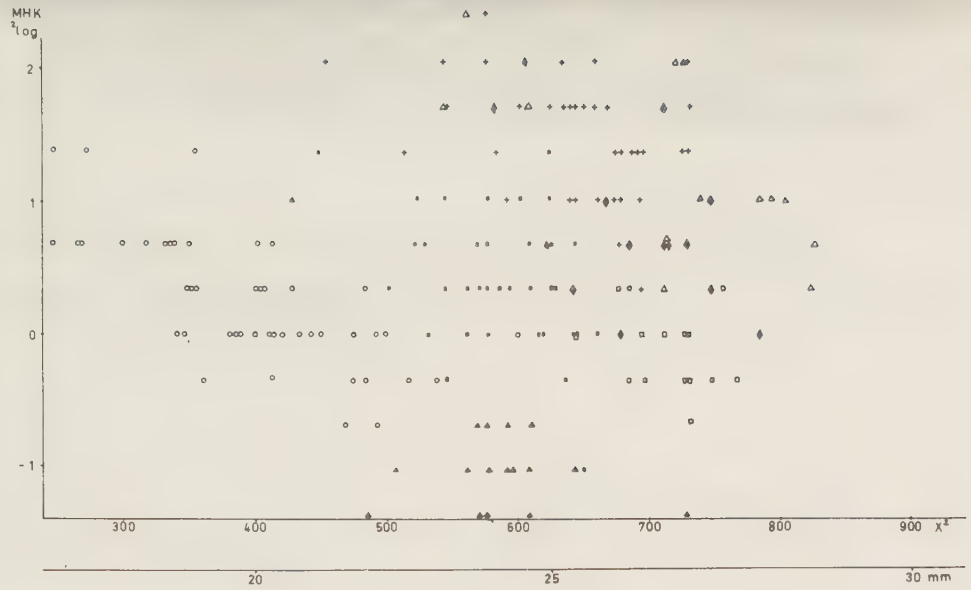

Abb.5 Beziehungen zwischen den minimalen Hemmkonzentrationen (Mittelwert aus 2 Bestimmungen gemessen in Mueller-Hinton-Bouillon) und den zugehörigen Hemmhofdurchmessern (Mittelwert aus 3 Bestimmungen gemessen auf Mueller-Hinton-Agar mit 10 ug Gentamicinblättchen) bei den Spezies: ○ Pseudomonas aeruginosa, ● E.coli, ✦ Proteus mirabilis, ♦ Proteus vulgaris, ▲ Proteus rettgeri, ▲ Klebsiella Aerobacter, □ Proteus morganii.

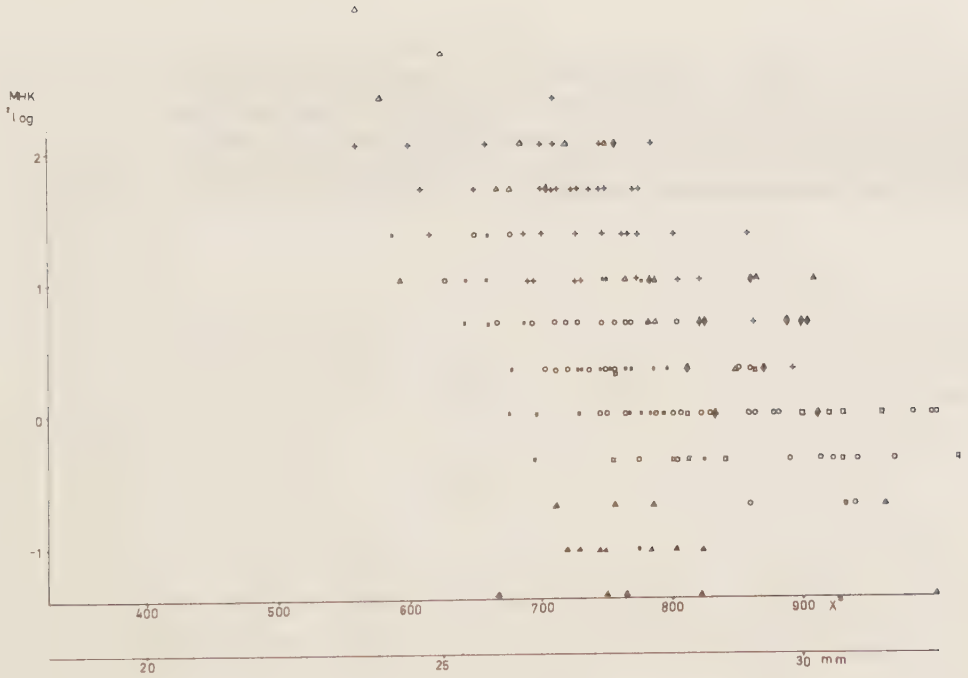

Abb. 6 Beziehungen zwischen den minimalen Hemmkonzentrationen (Mittelwert aus 2 Bestimmungen gemessen in Mueller-Hinton-Bouillon) und den zugehörigen Hemmhofdurchmessern (Mittelwert aus 3 Bestimmungen gemessen auf D.S.T.-Agar mit 10 ug Gentamicintestblättchen) bei den Spezies: o Pseudomonas aeruginosa, ● E.coli, + Proteus mirabilis, ▲ Proteus vulgaris, ◆ Proteus rettgeri, ▲ Klebsiella Aerobacter,

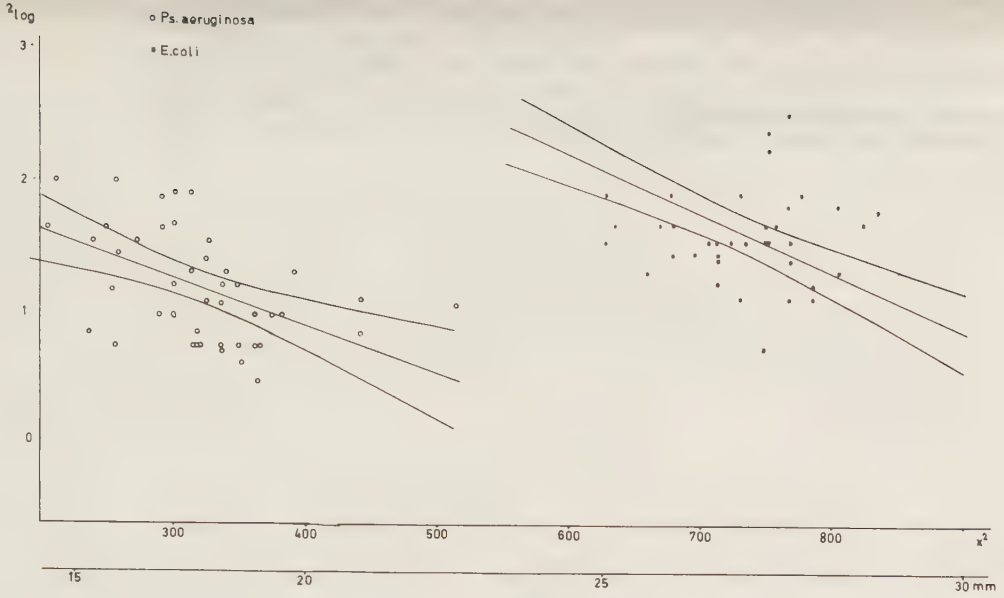

Abb.7 Regressionsgeraden für die Beziehung zwischen Hemmhofdurchmesser (HHØ) und der in ^{2}log transformierten minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) bei Pseudomonas aeruginosa und E.coli.
HHØ: Mittelwert aus 3 Bestimmungen gemessen auf Normalagar mit 10 ug Gentamicinblättchen.
MHK: Mittelwert aus 3 Bestimmungen gemessen mit dem Agarverdünnungstest (D.S.T.-Agar).

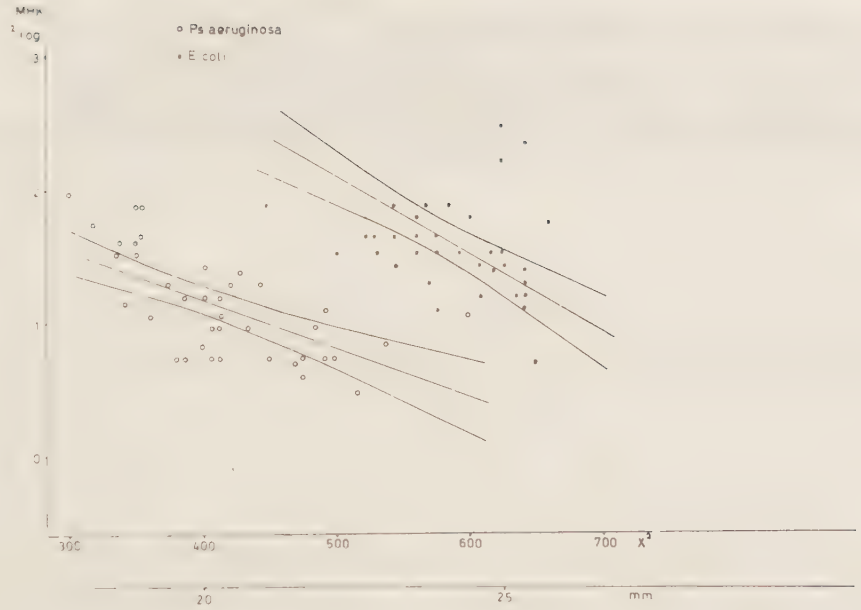

Abb. 8 Regressionsgeraden für die Beziehung zwischen Hemmhofdurchmesser (HHØ) und der in ^{2}log transformierten minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) bei Pseudomonas aeruginosa und E.coli.
HHØ: Mittelwert aus 3 Bestimmungen gemessen auf Mueller-Hinton-Agar mit 10 ug Gentamicinblättchen.
MHK: Mittelwert aus 3 Bestimmungen gemessen mit dem Agarverdünnungstest (D.S.T.-Agar).

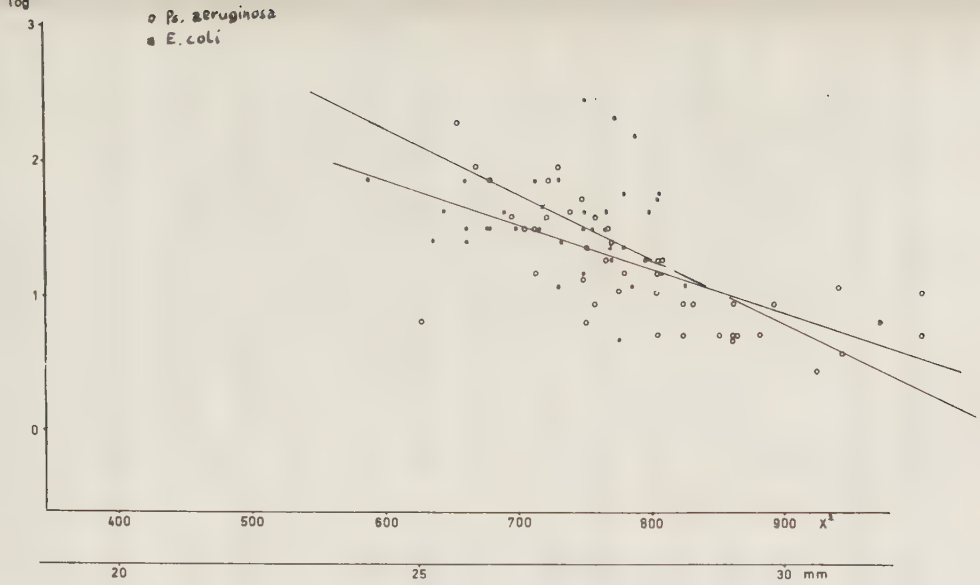

Abb. 9 Regressionsgeraden für die Beziehung zwischen Hemmhofdurchmesser (HHØ) und der in ^{2}log transformierten minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) bei Pseudomonas aeruginosa und E.coli.
HHØ: Mittelwert aus 3 Bestimmungen gemessen auf D.S.T.-Agar mit 10 ug Gentamicinblättchen.
MHK: Mittelwert aus 3 Bestimmungen gemessen mit dem Agarverdünnungstest (D.S.T.-Agar).

V. Diskussion

1. Hemmhoftheorie

Die Formel von COOPER (1955),

$$x^2 = 4DT_o \cdot 2{,}3 (\log m_o - \log m')^{o}$$

versucht die Hemmhofgröße im Agarmedium zu erklären. Die kritische Dichte der Bakterien N' (N' ist in T_o enthalten; $T_o = L + 3{,}32\ G \cdot \log \frac{N'}{N_o}$) ist ebenso wichtig wie die kritische Antibiotikumkonzentration m'. Unter kritischer Dichte versteht man diejenige Keimzahldichte, bei welcher ein weiterer Anstieg der Antibiotikumkonzentration gegenüber der Bakterienvermehrung wirkungslos ist. Aus diesem Grunde muß die kritische Antibiotikumkonzentration vor der kritischen Keimzahldichte erreicht sein, damit ein Hemmhof entstehen kann. Die kritische Zeit (T_o), bei welcher kein Hemmhof mehr entstehen kann, läßt sich für Gentamicin nach Abbildung 3 auf sechs bis sieben Stunden schätzen. Die Zeitspanne, in welcher diese kritische Bakteriendichte erreicht wird, umfaßt nach SCHLESINGER (1954) die Lagphase (L) und drei bis vier Generationszyklen. Durch die Eigentümlichkeit der Bakerien, nach einer unterschiedlich langen Lagphase mit der Zellteilung zu beginnen (ERICSSON, 1960, CHADWICK, 1969), kann die kritische Keimzahl-

---

o Streng genommen gilt diese Gleichung nur für die Zylinder-Test-Methodik.

x = Hemmhofdurchmesser
D = Diffusionskoeffizient des Antibiotikums
T_o = Zeit der Präinkubation, bei der kein Hemmhof entsteht
m_o = Konzentration der Antibiotikumlösung im Zylinder
m' = kritische Konzentration des Antibiotikums am Hemmhofrand
G = Generationszeit
L = Lagperiode
N_o = Inokulumgröße
N' = kritische Dichte der Bakterien

dichte zeitlich früher oder später erreicht werden. Bleibt somit das Antibiotikumkonzentrationsgefälle während der Lagphase und der anschließenden Keimvermehrung im Agarmedium nicht konstant, so werden Keime gleicher Empfindlichkeit und gleicher Vermehrungsgeschwindigkeit, aber kürzerer Ruhephase einen kleineren Hemmhofdurchmesser haben, als jene Keime mit längerer Ruhephase.

Die Gentamicindiffusion in D.S.T.-Agar wurde mit dem sogenannten "Handicap-Test" untersucht (vgl. Tab. 11 und Abb 3). Bei diesem Test wurde die Zeitdauer der Gentamicindiffusion im D.S.T.-Agar gegenüber der kritischen Keimzahldichte variiert. Es konnte gezeigt werden, daß das Gentamicinkonzentrationsgefälle auch nach einer Prädiffusionszeit von 3 Std. und 4 Std. nicht stabil bleibt, sondern sich weiter in den D.S.T.-Agar hinein verschiebt. Das bedeutet, daß die Reproduzierbarkeit von Meßergebnissen mit dem Agardiffusionstest auf D.S.T.-Agar mit Gentamicin durch die oben erwähnte Eigentümlichkeit der Bakterien von vornherein ungenau ist. Weiterhin zeigt der Test, daß der Stamm von E.coli jeweils den kleinsten Hemmhofdurchmesser aufweist, obwohl er im Agarverdünnungstest und Röhrchenverdünnungstest empfindlicher ist als die entsprechenden Stämme von Proteus rettgeri, Proteus mirabilis und Proteus vulgaris. Eine Interferenz der Spezies E.coli mit der Agarsorte konnte durch die Varianzanalyse weitgehend ausgeschlossen werden. Die Spezies E.coli hat nämlich auf D.S.T.-Agar ihre größten Hemmhofdurchmesser. Somit könnte eine kurze Lagphase und/oder eine schnellere Vermehrungsgeschwindigkeit dieses Stammes von

E.coli die Entstehung des relativ kleinen Hemmhofes erklären, sofern natürlich die gemessene minimale Hemmkonzentration der wahren Empfindlichkeit des Keimes entspricht.

2. Vorteile und Nachteile von Agarmedien

Von den vier untersuchten Agarmedien zeigten die Hemmhofdurchmesser auf dem Penassay Seed Agar von Difco den kleinsten Hemmhofdurchmesser. Die Ursache hierfür ist vor allem im niedrig pH-Wert des Nährbodens, der etwa 6,6 beträgt, zu suchen. Bei einer Verschiebung des pH-Wertes auf die von der World Health Organisation empfohlenen Werte von 7,2 - 7,4 steigt der Hemmhofdurchmesser um nahezu 10 mm an (vgl. Tab. 9 und Abb.1). Da der Kurvenverlauf gerade im neutralen Bereich stark gestreckt ist und somit schon geringe pH-Änderungen relativ große Unterschiede im Hemmhofdurchmesser verursachen, wurde der Penassay-Seed-Agar von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Auch bei den anderen Nährmedien ist der Kurvenverlauf im neutralen Bereich gestreckt, so daß große Versuchsfehler beim Agardiffusionstest erwartet werden können, wenn nicht von vornherein der Nährboden gegen pH-Änderungen exakt gepuffert wird.

Wie die Varianzanalyse gezeigt hat, wirkt sich der Einfluß einer bestimmten Agarsorte nicht gleichmäßig auf die verschiedenen Spezies aus, sondern es kommt zu einer Wechselwirkung zwischen der jeweiligen Agarsorte und der einzelnen Spezies. Am deutlichsten ist diese Wechselwirkung bei der Spezies Pseudomonas aeruginosa ausgeprägt, welche auf Normalagar den niedrigsten und auf D.S.T.-Agar den größten Hemm-

hofdurchmesser zeigt. Der D.S.T.-Agar ist gegen pH-Änderungen gepuffert und enthält den gereinigten Ionagar No. 2. Bereits WAITZ und WEINSTEIN (1969) machten auf die Sonderstellung von Ionagar No. 2 aufmerksam, indem sie Penassay-Seed-Broth und Nutrient Broth mit diesem versetzten und dabei mit 10 ug Gentamicinblättchen im Durchschnitt 10 mm größere Hemmhofdurchmesser erhielten. Auch mit dem von der World Health Organisation empfohlenen festen Agarnährboden konnten SANDER und BLASIUS (1968) für Pseudomonas aeruginosa einen zu kleinen Hemmhofdurchmesser gegenüber der guten Empfindlichkeit im Röhrchenverdünnungstest feststellen.

Indessen scheinen neuere Untersuchungen von GARROD und WATERWORTH (1969), HAMEISTER (1970), TRAUB (1970), GILBERT et al.(1971) und ZIMELIS und JACKSON (1972) das Problem gelöst zu haben. Durch Ca^{++} und Mg^{++} Ionen wird die Zellmembran von Pseudomonas aeruginosa gegen Gentamicin dergestalt stabilisiert, daß die antibiotische Wirkung nur in geringem Maße oder überhaupt nicht das Bakterium angreifen kann. Selbst bei sonst letalen Gentamicinkonzentrationen kann auf diese Weise die Vermehrung der Keime ungestört stattfinden. Dieser Effekt ist spezies-spezifisch für Pseudomonas aeruginosa und trifft auf alle Aminoglycosid-Antibiotika zu. Da diese günstigen Bedingungen für Pseudomonas aeruginosa im D.S.T.-Agar nicht bestehen, scheint dieser Agar einen optimalen Nährboden für die bakteriologische Untersuchungstechnik darzustellen.

3. Agarverdünnungstest contra Röhrchenverdünnungstest.

JACKSON und FINLAND (1951) haben in einer ausführlichen Arbeit die Festsetzung der minimalen Hemmkonzentration mit verschiedenen Methoden untersucht. Dabei konnten sie die Inoculumgröße, die Inkubationszeit und die Wahl zwischen partieller und totaler Hemmung als wichtigste Fehlerquellen für die Interpretation unterschiedlicher minimaler Hemmkonzentrationen verantwortlich machen. Nach WAISBREN (1951) sind innerhalb einer Röhrchenverdünnungsreihe drei bis vier Verdünnungsschritte erforderlich um signifikante Unterschiede zweier MHK-Werte zu erzielen. In dieser Größenordnung nämlich variieren die Resultate von einem Tag zum anderen. Schon SAVAGE (1964) konnte zeigen, daß Mediumeinflüsse die minimalen Hemmkonzentrationswerte um das 1000-fache verändern können.

Zahlreiche Untersuchungen wurden auch über den Einfluß verschiedener Salze auf Gentamicin gemacht (RUBENIS et al., 1963, HEPDING und WAHLIG, 1966, JACKSON, 1967), wobei nach RUBENIS et al. die Zunahme der Hemmkonzentrationen nicht spezifisch für die einzelnen Ionenarten ist, sondern durch andere Salze sowie durch Harnstoff ebenfalls hervorgerufen werden kann. GRÖTZINGER (1972) konnte selbst bei der von der World Health Organisation empfohlenen Bouillon erhebliche Unterschiede in der minimalen Hemmkonzentration zu anderen flüssigen Nährmedien feststellen, so daß eine Aussage über die Empfindlichkeit eines Keimes gegen Gentamicin nur bei extrem resistenten oder extrem empfindlichen Stämmen eindeutig ist.

In einer ausgedehnten Studie konnten ERICSSON und SHERRIS (1971) bei der Auswertung von Meßergebnissen des Röhrchenverdünnungstestes und des Agarverdünnungstestes eine geringfügig bessere Reproduzierbarkeit der Meßwerte des Agarverdünnungstestes finden. Der entscheidende Vorteil des Agarverdünnungstestes besteht darin, daß die ursprünglich bei der Beimpfung aufgetragenen Keime später als Kolonien sichtbar werden und eine Verunreinigung durch andere Keime sofort erkannt wird. Weiter kann man deutlich die partielle Hemmung verfolgen, wobei dann eine genauere Aussage über die Empfindlichkeit eines Keimes gemacht werden kann.

Die Meßergebnisse des Agarverdünnungstestes in dieser Arbeit liegen deutlich höher als jene des Röhrchenverdünnungstestes. Es wurde jedoch beim Agarverdünnungstest eine Inoculumgröße von ca. 10^6 Keimen pro Tropfen gewählt, während nach den Vorschlägen der World Health Organisationsgruppe um ERICSSON (1971) neuerdings 10^4 Keime pro Tropfen, als Inoculumgröße, vorgeschlagen werden. Überträgt man die Ergebnisse von KLEIN et al. (1964), bei denen die Reduzierung der Inoculumgröße von 10^6 auf 10^4 Keime einer Verdünnungsstufe im Röhrchenverdünnungstest entspricht, auf den Agarverdünnungstest, so würden sich die Meßergebnisse des Agarverdünnungstestes, bei einer Einsaat von 10^4 Keimen, jenen des Röhrchenverdünnungstestes weitgehend angleichen, bzw. würden sie nur geringfügig höher liegen.

Weiterhin konnten bei der Regressions- und Korrelationsanalyse mit den Meßwerten des Agarverdünnungstestes statistisch mehr signifikante Zusammenhänge aufgestellt werden, als mit den Werten des Röhrchenverdünnungstestes. Die Schlußfolgerung,

daß bei der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen dem Agarverdünnungstest der Vorrang gegeben werden soll, kann in dieser Arbeit nicht ohne weiteres gezogen werden, da bei der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen mit dem Agarverdünnungstest Zwischenverdünnungsstufen gemacht wurden und der jeweilige Mittelwert aus 3 Meßwerten bestand. Beim Röhrchenverdünnungstest lagen nur 2 Meßwerte vor.

4. Der Hemmhofdurchmesser als Kriterium einer Sensibilitätsbeurteilung.

In der Literatur findet man unterschiedliche Angaben über die Grenze von empfindlichen und resistenten Keimen gemessen am Hemmhofdurchmesser. Folgende Autoren verwendeten bei ihren Untersuchungen die Methodik von BAUER et al. (1966), bei welcher Mueller-Hinton-Agar verwendet wird. Die Papierblättchen haben dabei jedoch einen Durchmesser von 6 mm und die Beimpfung erfolgt mit einem Wattetupfer:

So sieht COX (1969) die Grenze zwischen empfindlich und resistent bei einem Hemmhofdurchmesser von 15 mm, bei einer Blättchenbeschickung von 10 ug Gentamicin. Bei gleicher Blättchenbeschickung setzen KIRBY und STANDIFORD (1969) diese Grenze bei einem Hemmhofdurchmesser von 12 bis 13 mm. THRUPP (1969) konnte für 30 ug Gentamicinblättchen eine Trennungslinie bei 18 - 20 mm zwischen empfindlichen und resistenten Keimen ziehen. Unter Berücksichtigung der Eigenart von Pseudomonas aeruginosa konnte in dieser Arbeit sogar für 10 ug Gentamicinblättchen eine Trennungslinie bei 20 mm Hemmhofdurchmesser gezogen werden, da praktisch alle Stämme einen

Hemmhofdurchmesser von über 20 mm auf allen drei Agarsorten aufweisen. Aus dem oben genannten wird ersichtlich, wie willkürlich eine Festsetzung der Grenze zwischen empfindlich und resistent erfolgen kann, wenn nicht unter gleichen Kriterien entschieden wird.

Da in dieser Arbeit Testblättchen mit 9 mm Durchmesser verwendet wurden, könnte dies die größeren Hemmhofdurchmesser erklären. Außerdem wurde von oben genannten Autoren der speziesspezifische Effekt von Pseudomonas aeruginosa auf Mueller-Hinton-Agar nicht in Betracht gezogen, so daß aus diesem Grunde die Hemmhofdurchmesser etwas niedriger liegen. Nach BAUER (1964 a) soll jedoch der Hemmhofdurchmesser ein zuverlässiger Gradmesser der Sensibilität sein, sofern das gleiche Nährmedium und Testblättchen gleicher Wirksamkeit benutzt werden.

5. Überprüfung der Regressionsgeraden mit Hilfe der "Standardgeraden".

Mitglieder der Arbeitsgruppe um ERICSSON (1971) haben eine Methode untersucht, welche es erlaubt, eine Regressionsgerade zu überprüfen. Die theoretischen Grundlagen dazu lieferte die Formel von COOPER (1955) : Werden Bakterien mit gleicher Vermehrungsgeschwindigkeit vorausgesetzt, so sind die graphischen Darstellungen nachfolgender Beziehungen identisch.

1. Die Beziehung zwischen den in $^{2}\log$ transformierten minimalen Hemmkonzentrationen und den Hemmhofdurchmessern, die als Regressionsgerade bezeichnet wird.

2. Die Beziehung zwischen dem in $^{2}\log$ transformierten Antibiotikumgehalt der Testblättchen und den Hemmhofdurchmessern, die als "Standardgerade" bezeichnet wird.

Um eine ungefähre Vorstellung über den Zusammenhang zwischen Blättchenbeschickung und der entsprechenden Antibiotikumkonzentration zu bekommen, wurde zur Bestimmung der Standardgeraden ein modifizierter Agardiffusionstest angewendet. Wegen seiner Vorzüge wurde der D.S.T.-Agar verwendet. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 10 und Abb. 2 dargestellt.

Wie man sieht, läßt sich hiermit eine eindeutige Beziehung zwischen Hemmhofdurchmesser und Blättchenkonzentration resp. Blättchenbeschickung aufstellen. Ein Anstieg um eine Verdünnungsstufe entspricht einer Zunahme des Hemmhofdurchmessers um 3 mm. Da die höchstzulässige Serumkonzentration von Gentamicin bei 8 ug/ml (SANDER und BLASIUS, 1968) liegt, wäre es zweckmäßig, bei der Sensibilitätsbestimmung mit Gentamicin dasjenige Agarscheibchen mit 8 ug/ml als Standardblättchen zu benutzen. Würde sich bei diesem Agarscheibchen irgendein Hemmhof bilden, so wäre der betreffende Keim als empfindlich zu bewerten. Weiterhin könnte man aus der Größe des Hemmhofdurchmessers auf die jeweilige Empfindlichkeit schließen, wenn man die oben genannte Beziehung von einer Verdünnungsstufe zur Hemmhofdifferenz von 3 mm zugrunde legt. Ein Hemmhofdurchmesser von 15 mm um ein Agarscheibchen mit einer Gentamicinkonzentration von 8 ug/ml würde einer Keimempfindlichkeit von 2 ug/ml entsprechen. In die Hemmhofdifferenz von 6 mm gehen 2 Verdünnungsstufen ein.

Durch weitere Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß die Absorptionsfähigkeit der verwendeten Agarscheibchen etwa gleich groß war, wie die der verwendeten Papierblättchen, so daß eine Übertragung der Ergebnisse auf Papierblättchen erlaubt erscheint. Legt man den errechneten Umrechnungsfaktor von 13,3

zugrunde, so entspricht ein mit 10 ug Gentamicin beschicktes Testblättchen einem Agarscheibchen mit einer Gentamicinkonzentration von 133 ug/ml. Ein 21 mm großer Hemmhofdurchmesser um ein Gentamicinblättchen mit 10 ug würde somit einer Keimempfindlichkeit von 8 ug/ml entsprechen. In die Hemmhofdifferenz von 12 mm gehen vier Verdünnungsstufen ein. Diese Betrachtung stimmt erstaunlich gut mit der weiter vorne festgelegten Grenze zwischen empfindlichen und resistenten Keimen bei einem Hemmhofdurchmesser von 20 mm überein.

Überprüft man nun die einzelnen Regressionsgeraden mit der "Standardgeraden", so stimmt die Steigung der Regressionsgeraden nur bei E.coli mit der Steigung der Standardgeraden überein. Alle anderen Regressionsgeraden verlaufen viel flacher, wobei dann einer Verdünnungsstufe durchschnittlich eine Zunahme im Hemmhofdurchmesser von ca. 6 mm entspricht. Mit den Werten der minimalen Hemmkonzentrationen aus dem Agarverdünnungstest verlaufen die Steigungen der Regressionsgeraden bei allen Spezies, sofern signifikante Verhältnisse vorliegen, flacher als die entsprechenden Steigungen mit den minimalen Hemmkonzentrationen aus dem Röhrchenverdünnungstest. Andererseits ist mit den Werten aus dem Röhrchenverdünnungstest eher eine Tendenz von r gegen -1, also in Richtung eines funktionalen Zusammenhanges festzustellen. Je flacher eine Regressionsgerade verläuft, umso einheitlicher ist die Sensibilität der Stämme innerhalb einer Spezies bezüglich der minimalen Hemmkonzentrationen und umso mehr streuen die entsprechenden Hemmhofdurchmesser. Dies gilt auch umgekehrt: Je steiler eine Regressionsgerade verläuft, umso einheitlicher sind die Hemm-

hofdurchmesser und umso mehr streuen die entsprechenden minimalen Hemmkonzentrationen.

6. Der Einfluß von Wechselwirkungen auf die Hemmhofgröße

Wie die Abb. 4 bis 6 zeigen, haben die Punktewolken der einzelnen Spezies unterschiedliche Lagen zueinander. So zeigen vor allem Pseudomonas aeruginosa und Klebsiella-Aerobacter relativ kleine Hemmhofdurchmesser bei niedrigen Hemmkonzentrationswerten. Diese Lageunterschiede der einzelnen Spezies können durch die signifikanten Wechselwirkungen zwischen Agar und Spezies, Beschickung und Spezies sowie Agar und Beschickung zustande kommen, vorausgesetzt die minimalen Hemmkonzentrationen geben die wahre Keimempfindlichkeit an.

Die Wechselwirkung zwischen Agar und Spezies ist am deutlichsten ausgeprägt. Sie ist für die Diskrepanz innerhalb der regressiven Beziehungen zwischen den Hemmhofdurchmessern und den minimalen Hemmkonzentrationen verantwortlich. Pseudomonas aeruginosa und Klebsiella-Aerobacter haben einen deutlich größeren Hemmhof auf D.S.T.-Agar gegenüber dem Normalagar. Proteus morganii dagegen hat einen deutlich größeren Hemmhof auf Normalagar. Bei allen anderen Spezies ist der Hemmhof auf Normalagar und D.S.T.-Agar nahezu gleich groß. Auffallend sind auch die rel. kleinen Hemmhöfe bei Klebsiella-Aerobacter, obwohl die minimalen Hemmkonzentrationen mit beiden Verdünnungsmethoden diese Spezies als empfindlich kennzeichnen.

Die Wechselwirkungen zwischen Beschickung und Spezies sowie Agar und Beschickung sind zwar signifikant, jedoch nur geringgradig ausgeprägt. Bei zunehmender Beschickung ist die Zunahme

der Hemmhofdurchmesser nicht konstant bei allen Spezies, sondern unterschiedlich. Besitzen somit zwei Stämme verschiedener Spezies die gleiche Empfindlichkeit, so hätte der Stamm, welcher der Spezies mit größerer Hemmhofzunahme angehört, schließlich einen größeren Hemmhofdurchmesser, als jener Stamm, welcher der Spezies mit kleinerer Hemmhofzunahme angehört.

Die Wechselwirkung zwischen Agar und Beschickung zeigt, daß die Zunahme der Hemmhofdurchmesser auf D.S.T.-Agar bei steigender Beschickung am größten ist.

Da der Einfluß der Wechselwirkungen insgesamt beim D.S.T.-Agar am geringsten ausgeprägt ist, scheint dieser Agar zur Sensibilitätsbestimmung mit der Diffusionsmethode am geeignetsten zu sein. Die Zunahme der Hemmhofdurchmesser auf D.S.T.-Agar, bei Verdopplung des Gentamicingehaltes der Testblättchen von 10 ug auf 20 ug ist kleiner als die bei der Aufstellung der "Standardgeraden" errechneten 3 mm. Da somit bei höherer Gentamicinbeschickung der Testblättchen der Rückschluß vom Hemmhofdurchmesser auf die minimale Hemmkonzentration nicht ohne weiteres angewendet werden darf, sollten bei der Sensibilitätsbestimmung mit dem Agardiffusionstest Testblättchen mit niedriger Gentamicinbeschickung verwendet werden. Aus weiter vorne gezeigten Überlegungen sollte eine Hemmhofgrenze zwischen resistenten und empfindlichen Keimen bei 20 mm für 10 ug Gentamicinblättchen gewählt werden.

VI. Zusammenfassung

Auf vier verschiedenen Agarnährböden wurde die Gentamicinempfindlichkeit von 188 gramnegativen Bakterienstämmen aus sieben Spezies mit dem Agardiffusionstest untersucht. Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration erfolhte mit dem Röhrchenverdünnungstest und dem Agarverdünnungstest. Es konnten hierbei folgende Ergebnisse festgestellt werden:

1. Die Hemmhofdurchmesser zeigen signifikante Unterschiede bei drei Agarsorten. Diese Unterschiede sind auf signifikante Wechselwirkungen zwischen Agarnährboden und Beschickung, Agarsorte und Spezies, Beschickung und Spezies sowie Agarsorte und Stamm (innerhalb einer Spezies) zurückzuführen.
2. Diese Unterschiede führen jedoch nur bei der Spezies Pseudomonas aeruginosa auf Normalagar und Mueller-Hinton-Agar zu einer falschen Interpretation der Hemmhofdurchmesser. Alle anderen Spezies nämlich (E. coli, Proteus mirabilis, Proteus rettgeri, Proteus morganii, Proteus vulgaris, Klebsiella-Aerobacter) haben auf den drei Agarnährböden, bei einer 10 ug Gentamicinbeschickung der Testblättchen, einen Hemmhofdurchmesser von mehr als 20 mm.
3. Ein Hemmhofdurchmesser von 20 mm um ein 10ug Gentamicintestblättchen konnte, mit Hilfe eines modifizierten Agardiffusionstestes, als Grenze zwischen resistenten und empfindlichen Keimen gezogen werden.
4. Es wurde die Steigung der Regressionsgeraden für Gentamicin mit Hilfe der "Standardgeraden" bestimmt. Diese Steigung

besagt, daß die Zunahme des Hemmhofdurchmessers um 3 mm einer Verdünnungsstufe bei den minimalen Hemmkonzentrationen entspricht. Diese Voraussetzung wird nur vom Keim E.coli erfüllt. Alle anderen Spezies zeigen eine flachere Regressionsgerade . Da mit höherer Blättchenbeschickung die Regressionsgeraden flacher werden, wird der Schluß gezogen, daß eine Gentamicinbeschickung von 10 ug und höher schließlich zu einer falschen Beziehung zwischen Hemmhofdurchmesser und minimaler Hemmkonzentration führt.

VII. Literaturverzeichnis

1. BAUER, A.W., W.M.M. KIRBY, J.C. SHERRIES and M. TURCK:
Antibiotic Susceptibility testing by a standardized single Disk Method.
Amer. J. of Clin. Path. 45, 493 - 496 (1966).

2. BAUER, A.W. (a):
The Significance of Bacterial Inhibition Zone Diameters.
A Study of the Factors Influencing Antibiotic Disc Sensitivity Test.
III. Int. Congr. of Chemotherapy,
Verhandlungen 3, Vol. 1,
Stuttgart: Thieme 1964, 465 - 479.

3. BAUER, A.W. (b):
The two Definitions of Bacterial Resistance.
III. Int. Congr. of Chemotherapy,
Verhandlungen 3, Vol. 1,
Stuttgart: Thieme 1964, 484 - 500.

4. CHADWICK, P.: An Analysis of Irregular Growth Responses in the Microcolony Method for Testing Antibiotic Sensitivity of Bacteria.
Canad. Med. Ass. J. 100/20, 941 - 947 (1969).

5. COOPER, K.E.: Theory of Antibiotic Inhibition Zones in Agar Media.
Nature 187, 510 - 511 (1955).

6. COX, C.E.: Gentamicin, a New Aminoglycoside Antibiotic: Clinical and Laboratory Studies in Urinary Tract Infection.
Journal of Inf. Dis. 119, 486 - 491 (1969).

7. ERICSSON, H.: A Paper Disk Method for Determination of Bacterial Sensitivity of Chemotherapeutic and Antibiotic Agents
Scand. J. Clin. & Lab. Invest. Supp. 11, 1 - 16 (1954).

8. ERICSSON, H.: Rational Use of Antibiotics in Hospitals.
Scand. J. Clin. & Lab. Invest. Supp. 50, 1 - 59, (1960).

9. ERICSSON, H.: (Hrsg.)
Standardization of Methods for Conducting Microbic Sensitivity Tests.
Stockholm: Karolinska Sjukhuset 1964.

10. ERICSSON, H. and J.C. SHERRIS:
Antibiotic Sensitivity Testing
Report of an Intern. Collaboratic Study.
Acta Pathologica et Microbiologica Scand,
Section B 1971, Suppl. 217, (1971).

11. GARROD, L.P. and P.M. WATERWORTH:
Effect of Medium Composition on the Apparent Sensitivity of Pseudomonas Aeruginosa to Gentamicin.
J. Clin. Path. 22, 534 - 538 (1969).

12. GIBBS, M. and F.A. SKINNER:
Identification Methods for Microbiologists. Part A
1. Aufl. London, New York:
Academic Press 1966.

13. GILBERT, D.N., E. KUTSCHER, P. IRELAND, J.A. BARNETT and J.P. SANFORD: Effect of the Concentrations of Mg and Ca on the in vitro Susceptibility of Pseudomonas Aeruginosa to Gentamicin.
Journal of Inf. Dis. 124, 37 - 45 (1971).

14. GRÖTZINGER, A.:Zur Gentamicinempfindlichkeit einiger gramnegativer Bakterienarten in verschiedenen Nährmedien.
Inaugural Dissertation Tübingen 1972.

15. HAMEISTER, W.: Der Einfluß der Mg^{++}- und Ca^{++}-Ionen auf die Wirksamkeit von Gentamicin gegen Ps.aeruginosa im Agardiffusionstest.
Referat auf der 3. Arbeitstagung der Dtsch. Ges. für Hyg. und Mikrobiol.
Mainz 1970.

16. HEPDING, L., und H. WAHLIG:
Experimentelle Untersuchungen über ein neues Antibioticum Gentamicin.
Arzneimittelforschung 16, 1 - 11 (1966).

17. HUGH, R. and E. LEIFSON:
The Taxonomic Significance of Fermentative versus Oxidative Metabolism of Carbohydrates by Various Gram-negative Bacteria.
J. Bact. 66, 24 - 26 (1953).

18. JACKSON, G.G. and M. FINLAND:
Comparison of Methods for Determining Sensitivity of Bacteria to Antibiotics in vitro.
Arch. Intern. Med. 88, 446 - 460 (1951).

19. JACKSON, G.G.: Laboratory and Clinical Investigation of Gentamicin.
Gentamicin, First International Symposium
Paris 1967, 62 - 74.

20. KING, E.O, M.K. WARD, and D.E. RANEY:
Two Simple Media for the Demonstration of Pyocyanin and Fluorescin.
J. Lab. Clin. Med. 44, 401 - 405 (1954).

21. KIRBY, W.M.M. and H.C. STANDIFORD:
Gentamicin: In vitro Studies.
J. Infect. Dis. 119, 361 - 363 (1969).

22. KLEIN, J.O., T.C. EICKHOFF and M. FINLAND:
Activity in vitro and Observations in 26 Patients.
Amer. J. Med. Sci. 248, 528 - 543 (1964).

23. KOVACS, N.: Identification of Pseudomonas pyocyanea by the Oxidase Reaction.
Nature, 178, 703 - 704 (1956).

24. RUBENIS, M., V.M. KOZIJ and G.G. JACKSON:
Laboratory Studies on Gentamicin.
Antimicrob. Agents Chemother. 153 - 156 (1963).

25. SANDER, J., and C. BLASIUS:
Untersuchungen über die Wirksamkeit von Gentamicin gegen bestimmte gramnegative Stäbchenbakterien.
Dtsch. med. Wschr. 93, 1401 - 1404 (1968).

26. SAVAGE, G.M.: Some Problems in the Laboratory Evaluation of New Antibiotics.
III. Int. Congr. Chemother. Stuttgart
Verh. 3, Vol. 1, 276 - 283 (1964).

27. SCHLESINGER, F.G.:
Sensitivity tests by means of diffusion methods and their clinical interpretation.
Acta med. Scandinav. 148, 357 - 364 (1954).

28. SCHOOP, H.-D.: unveröffentlichte Mitteilung (1970).

29. SCHOOP, H.-D. und K. KOSHIDA:
Zweizucker-Eisen-Agar mit Anzeige der Desaminierun aromatischer Aminosäuren, ein polytropes Differenzierungsmedium für Enterobacteriaceae.
Zbl. Bakt. I (O) A 225, 42 - 45 (1973).

30. SMITH, D.H.: R-Factors for Aminoglycoside Antibiotics.
Journ. Inf. Dis. 119, 378 - 380 (1969).

31. THRUPP, L.D.: Round Table Discussion.
J. Inf. Dis. 119, 382 - 384 (1969).

32. TRAUB, H.W.: Susceptibility of Pseudomon. Aerug. to Gentamicin Sulfate in vitro: Lack of Correlation between Disc Diffusion and broth Dilution Sensitivity Data.
Appl. Microbiol. 20, 98 - 102 (1970).

33. WAISBREN, B.A., C. CIRR and J. DUNETTE:
The Tube Dilution Method of Determining Bacterial Sensitivity to Antibiotics.
Amer. J. Clin. Path. 21, 884 - 891 (1951).

34. WAITZ, J.A. and J.M. WEINSTEIN:
Recent Microbiological Studies with Gentamicin.
Journ. Inf. Dis. 119, 355 - 360 (1969).

35. WALTER, A.M. und L. HEILMEYER:
Antibiotika Fibel.
2. Auflage, Stuttgart: 1965
Thieme Verlag.

36. WATANABE, T.: Infective Heredity of Multiple Drug Resistance in Bacteria.
Bact. Rev. 27, 87 - 115 (1963).

37. WEINSTEIN, M.J., G.M. LUEDEMAN, E.M. ODEN and G.H. WAGMAN:
Gentamicin, a New Broad Spectrum Antibiotic Complex.
Antimicrob. Agents Chemother. 1 - 7 (1963).

38. WORLD HEALTH ORGANISATION:
Standardization of Methods for Conducting Microbic Sensitivity Tests.
Technical Report Series No. 210, 1 - 24 (1961).

39. ZIMELIS, V.M. and G.G. JACKSON:
Activity of Aminoglycoside Antibiotics against Pseudomonas aeruginosa: Specificity and Site of Calcium and Magnesium Antagonism.
The Journal of Infect. Dis. 127, No. 6, 663 - 669 (1972).

Am Schluß dieser Arbeit möchte ich mich für die freundliche Unterstützung und stets großzügige Förderung durch Herrn Professor Dr. med. Richard-Ernst Bader bedanken.

Herrn Dr. med Dietrich H. Schoop danke ich für das Thema und seinen sachkundigen Rat bei der Durchführung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Professor Dr. Maria-Pia Geppert und Fräulein Dr. Kathrin Boehme vom Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Lebenslauf

Am 14. Oktober 1943 wurde ich, Roland Keilhauer, als Sohn des Notars Martin Keilhauer und seiner Ehefrau Katharina in Putinci/Jugoslawien geboren. Nach der Umsiedlung nach Deutschland erfolgte 1950 die Einschulung in Kornwestheim. In den Jahren 1952 bis 1956 besuchte ich die Volksschule in Stuttgart-Zuffenhausen, ab Frühjahr 1956 das Gymnasium in Korntal. An dieser Schule bestand ich im März 1965 die Reifeprüfung.

Im Sommersemester 1965 begann ich das Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen, wo ich das gesamte Studium absolvierte. Im Wintersemester 1965/66 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung, im Wintersemester 1967/68 die ärztliche Vorprüfung und am 30.7.1971 die ärztliche Prüfung.

Meine Medizinalassistentenzeit begann im September 1971 an der Universitäts-Kinderklinik in Tübingen, wo ich fünf Monate lang tätig war. Von Februar bis Mai 1972 war ich an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen beschäftigt. Anschließend arbeitete ich, bis zu meiner Einberufung in die Bundeswehr im Januar 1973, in der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik in Tübingen.